

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

N° 504

**Etude du Métabolisme et de l'Élimination
de l'Hydromorphone (Dilaudid)
et de la Dihydrone (Eukodal)**

THÈSE

DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon, le 18 Février 1964

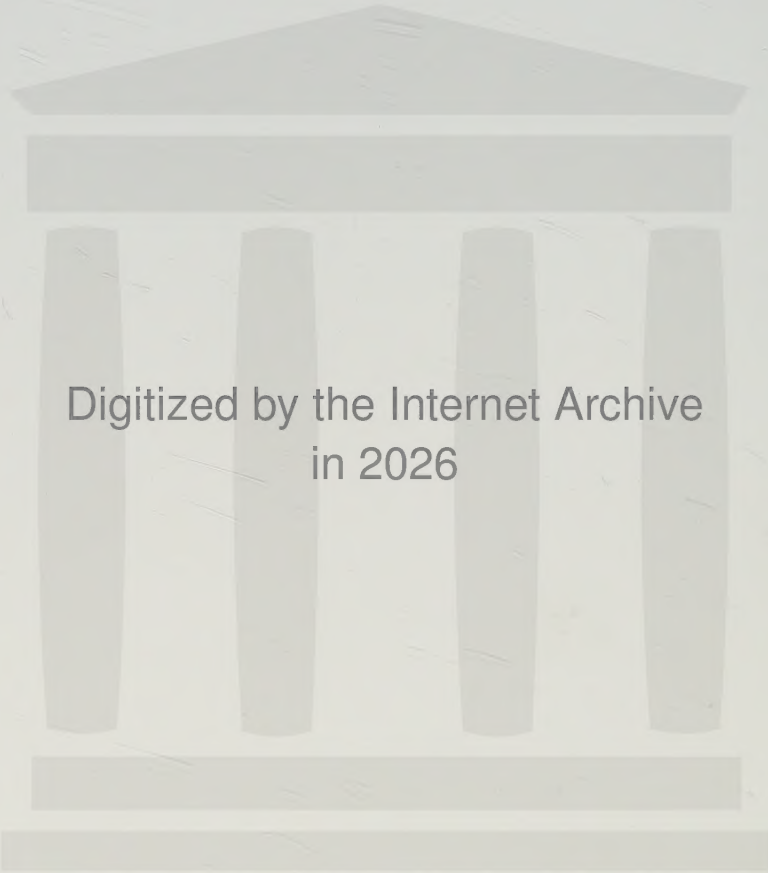
Henri CRETIN

Assistant au Laboratoire de Chimie Organique et Toxicologie
Né le 29 Octobre 1936, à Lyon



IMPRIMERIE AUGUSTE CRETIN
6, Rue des Capucins
LYON (1^{er})

—
1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Etude du Métabolisme et de l'Élimination
de l'Hydromorphone (Dilaudid)
et de la Dihydrone (Eukodal)**

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

N° 504

**Etude du Métabolisme et de l'Élimination
de l'Hydromorphone (Dilaudid)
et de la Dihydrone (Eukodal)**

THÈSE

DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon, le 18 Février 1964

Henri CRETIN

Assistant au Laboratoire de Chimie Organique et Toxicologie
Né le 29 Octobre 1936, à Lyon



IMPRIMERIE AUGUSTE CRETIN
6, Rue des Capucins
LYON (1^{er})

—
1964

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyens honoraires :

M. J. LEPINE, Membre de l'Institut - M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.-F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT - L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

Clinique urologique	MM. CIBERT
Physique biologique	PONTHUS (dét. à Beyrouth)
Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale	DECHAUME
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON
Clinique chirurgicale B	WERTHEIMER
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT
Clinique médicale C	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique chirurgicale A	MALLET-GUY
Pharmacie galénique	REVOL
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du travail	BOURRET
Clinique médicale A	LEVRAT
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER
Botanique et cryptogamie	NETIEN
Clinique chirurgicale C	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et déontologie	ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN
Clinique traumatologique des membres	CREYSSSEL
Clinique carcinologique	DARGENT
Anatomie pathologique	GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARIET
Pathologie chirurgicale	PEYCELON
Thérapeutique	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY
Radiologie	PAPILLON
Clinique des maladies infectieuses	JEUNE
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale.	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON
Physiologie B	CHATONNET
Clinique endocrinologique	GUINET
Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT
Clinique stomatologique	FREIDEL
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles	MARION Joseph
Matière médicale et législation pharmaceutique	DORCHE
Histologie et embryologie	DUMONT Louis
Chimie	PERROT
Physiologie A	CIER J.-F.
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	PERRIN J.
Clinique de Chirurgie Cardiaque	MICHAUD Pierre
Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	X...
Biologie médicale et pharmacodynamie	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER
Bactériologie	BERTOYE
Neuro-Chirurgie	MANSUY
Chimie pharmaceutique	COLLET
Clinique de pédiatrie	SARROUY
Climatologie	LACROIX
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS
Neuro-Chirurgie	LECUIRE
Médecine générale	REVOL
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André
Anatomie pathologique	FEROLDI
Physique biologique	MORET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

Chimie biologique	MM. CREYSSSEL Roger
Hygiène	THIVOLLET
Parasitologie	GARIN
Electro-radiologie	PINET
Botanique et cryptogamie	ODDOUX
Chimie analytique	DE SOLLIERS
Médecine du Travail	TOLOT
Médecine générale	DESPIERRE
Neuro-Psychiatrie	GUYOTAT
Chirurgie générale	DESCOTES
Pathologie expérimentale	JOUVET
Physique biologique	PEYRIN
Anatomie pathologique	TOMMASI
Electro-radiologie	BUFFARD
Médecine générale et thérapeutique	LEJEUNE
Stomatologie	DE MOURGUES F.
Maladies infectieuses	NAUSSAC
Chirurgie générale	REBOUILLAT
Pédiatrie	ROMAGNY
Médecine générale	DELAHAYE J.-P.
Anesthésiologie	DELEUZE R.
Electro-radiologie, diagnostic et thérapeutique	GIRAUD M.
Anesthésiologie	MICHEL

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Anatomie	MM. DUROUX
Thérapeutique	BRETTE
Anatomie	BOUCHET
Hématologie	FAVRE-GILLY
Histologie et embryologie	GIROD
Chimie biologique	GRAS
Chimie analytique	MALLEIN
Hygiène	RIFFAT
Biologie médicale et pharmacodynamie	FAUCON
Physiologie	FLANDROIS
Bactériologie	VIALIER-RAYNARD

AGREGES EN EXERCICE

MM.		MM.	
Obstétrique	BURTHIAULT	Neuro-chirurgie	ALLEGRE
Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS	Electro-radiologie	CHASSARD
Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX	Orthopédie	FAYSSÉ
Chirurgie générale	GUILLEMIN	Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD
Chirurgie générale	JAUBERT DE BEAUJEU	Médecine générale	GARDE
Chirurgie générale	MARION Pierre	Ophthalmologie	HUGONNIER
Médecine générale	PLAUCHU	Pneumo-phthisiologie	KALB
Médecine générale	PONT	Médecine générale	LARBRE
Chirurgie générale	SAUTOT	Chirurgie générale	MARET
Médecine générale	TRAEGER	Médecine générale	MORNEX
Médecine générale	VIGNON	Médecine générale	NORMAND
Ophthalmologie	BONAMOUR	Médecine générale	PERRIN André
Médecine légale	COLIN	Pédiatrie et puériculture	BETHENOD
Dermatologie	COLOMB	Stomatologie	DUMAS
Chirurgie générale	DE MOURGUES G.	Médecine générale	FRIES
Médecine générale	DEVIC	Obstétrique	GARMIER
Obstétrique	DUMONT Martial	Médecine générale	LAMBERT
Urologie	DURAND	Chirurgie générale	MICHOULLIER
Chirurgie générale	FRANCILLON	Médecine générale	NOEL
Chirurgie générale	SAUBIER	Médecine générale	ROBERT
Neuro-psychiatrie	SCHOTT	Orthopédie	SCHNEPP

EXAMINATEURS DE LA THESE :

MM. CHAMBON, Président ; ROCHE, PERROT, GRAS

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde
reconnaissance et de ma plus
tendre affection.

A MA FEMME

A MES FRERES

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CHAMBON

Professeur de Chimie Organique et de Toxicologie
Officier de la Légion d'Honneur

Qui fut toujours pour nous un Maître bienveillant. Il nous a inspiré notre travail et dirigé dans nos recherches, au cours desquelles il nous a prodigué ses conseils précis et éclairés.

Qu'il reçoive ici l'hommage de notre vive reconnaissance.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. ROCHE

Professeur de Médecine légale et Toxicologie médicale
Médecin des Hôpitaux

Il nous fait l'honneur de bien vouloir faire partie de notre Jury.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos sentiments respectueux.

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. PERROT

Professeur de Chimie
Pharmacien-Chef des Hôpitaux

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre vive reconnaissance pour son précieux enseignement, et pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

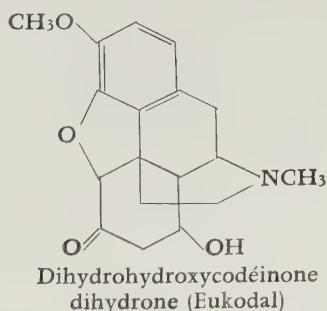
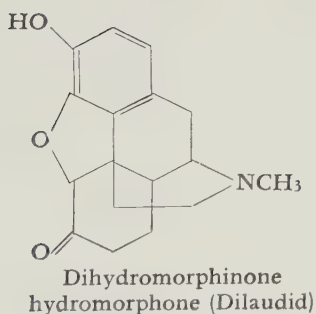
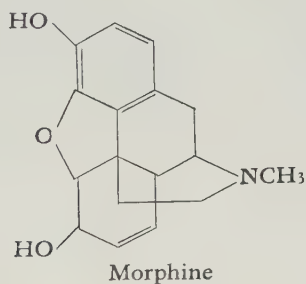
MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. GRAS

Qui a bien voulu lui aussi juger ce travail. Nous lui adressons nos très vifs et respectueux remerciements.

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

INTRODUCTION

L'hydromorphone (dihydromorphinone) et la dihydrone (dihydrohydroxycodéinone) sont des produits proches de la morphine, tant par leur structure que par leur activité.



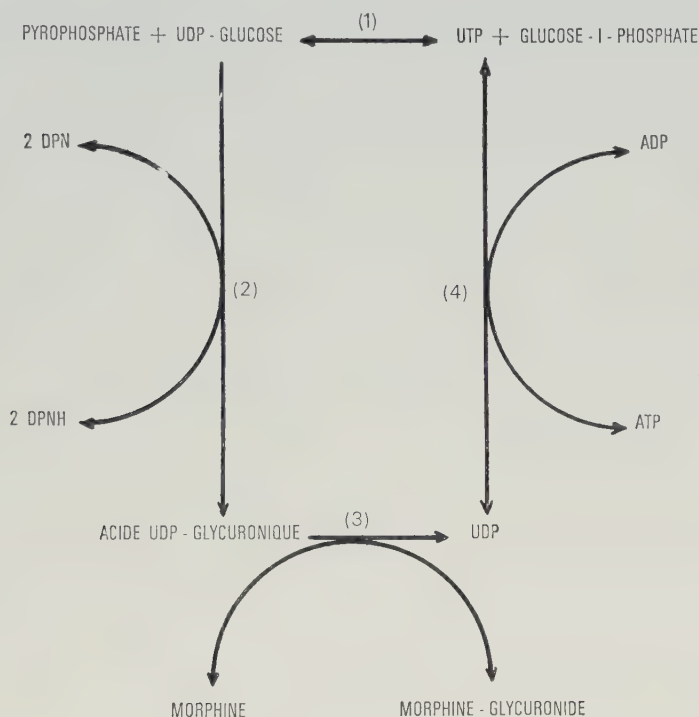
Ces deux dérivés introduits depuis longtemps en thérapeutique sous les noms déposés respectifs de Dilaudid (KNOLL) et d'Eukodal (MERCK) sont susceptibles comme la morphine d'engendrer une toxicomanie.

Aussi est-il nécessaire de pouvoir détecter ces toxiques dans l'organisme et tout particulièrement dans les urines.

A la suite des travaux de M. et P. CHAMBON, qui apportèrent des vues nouvelles sur le protocole à suivre dans la recherche de la morphine [21], nous avons essayé leur technique pour la détection de ces deux produits. Nous nous sommes ensuite proposé de voir si leur comportement dans l'organisme pouvait être assimilé à celui de la morphine ou de la codéine. Le métabolisme de la morphine qui a fait l'objet de travaux considérables est en effet déjà connu en grande partie.

C'est en 1924 avec R. FABRE [38] que commencèrent les premiers travaux sur le sort de la morphine dans l'organisme. Depuis les travaux de GROSS et THOMPSON [57] sur le chien, et d'OBERST [100] sur l'homme, l'excrétion dans les urines de morphine liée à côté de morphine libre fut amplement prouvée par FUJIMOTO [51] et WOODS [140]. En 1941, OBERST [101] avait suggéré la possibilité pour la morphine d'être excrétée sous forme de conjugué glycuronique. FUJIMOTO [48, 49], puis SEIBERT [121], confirment cette hypothèse et finalement WOODS [141] chez le chien et FUJIMOTO [50] chez l'homme, isolent le glycuronide de la morphine, résumant et confirmant ainsi tous les travaux précédents. La formation de ce composé conjugué est maintenant élucidée. Cette conjugaison, qui est la voie principale du métabolisme des drogues telles que la morphine, la N-allyl-Normorphine, l'hydroxy-3 N-méthylmorphinane (Dromoran) et la Codéine [10] est réalisée dans le foie au niveau des microsomes où un enzyme transfère l'acide glycuronique de l'acide UDP-glycuronique à un accepteur phénolique, la formation de l'acide UDP-glycuronique étant catalysée par un enzyme qui oxyde l'UDP-glucose et nécessite le diphosphopyridine-nucléotide (DPN) com-

me accepteur d'hydrogène [127]. Le schéma de TAKAMORI [128] ci-dessous résume assez bien cet enchaînement de réactions enzymatiques qui aboutit à la formation de morphine-glycuronide.



— La réaction (1) est catalysée par l'Uridine-diphosphoglucose-pyrophosphorylase (UDP-glucose-pyrophosphorylase).

— La réaction (2) est catalysée par l'Uridine-diphosphoglucose-déhydrogénase (UDP-glucose-déhydrogénase).

— La réaction (3) est catalysée par la Transférane.

— La réaction (4) est catalysée par la nucléotide-diphosphate-kinase (NDP-kinase).

Mais à côté de la morphine libre et de la morphine conjuguée, dans l'urine, on peut encore caractériser d'autres métabolites. MARCH et ELLIOTT chez l'homme en 1952 [88], ELLIOTT et collaborateurs chez le rat en 1954 [35], ACHOR et GEILING chez la souris en 1956 [2], puis MELLETT et WOODS chez le chien et le singe en 1961 [91], à l'aide de la N-C¹⁴ Méthyl-morphine ont montré l'excrétion de morphine marquée dans les urines mais aussi de C¹⁴O₂ pulmonaire et prouvèrent ainsi l'évidence d'une N-déméthylation partielle de la morphine. AXELROD, *in vitro*, a aussi démontré l'existence de cette N-déméthylation [9]. MISRA [94], à l'aide de la morphine marquée sur son cycle par le tritium, devait confirmer ces travaux chez le rat en caractérisant par chromatographie la Normorphine excrétée par voie urinaire (cette dernière étant d'ailleurs pour la plus grande partie excrétée sous forme conjuguée).

Cette déméthylation est réalisée par un système enzymatique localisé là encore dans les microsomes du foie et nécessite la présence de TPN réduit, d'oxygène et d'autres cofacteurs [9].

La codéine dans l'organisme semble subir aussi cette transformation (excrétion sous forme libre et sous forme liée) [101], cette dernière étant accompagnée d'une certaine dégradation : la O-déméthylation, contestée par WOODS et MUEHLENBECK [142] qui, dans leurs expériences sur le chien traité par la codéine, ne retrouvèrent aucune trace de morphine.

ADLER et LATHAM chez le rat [5], ADLER et SHAW sur des tranches de foie de rat [6], MANNERING chez l'homme [87], démontrèrent cette déméthylation, et AXELROD [8] localisa même le système enzymatique responsable de cette transformation dans les microsomes du foie et montra la nécessité pour la réalisation de ces processus enzymatiques, de la présence de TPN et d'oxygène.

De plus, il fut démontré aussi à côté de ces métabolites déjà connus (codéine libre, codéine conjuguée, morphine), la présence de Norcodéine excrétée elle aussi sous forme liée et sous forme libre [3].

Pour résumer l'ensemble du métabolisme de la codéine, nous pouvons citer les résultats trouvés par ADLER et collaborateurs [4] en 1955 chez des hommes ayant reçu une dose de 30 mg de phosphate de codéine marquée au C^{14} sur le groupement méthoxy. Ainsi dans les urines, ils retrouvèrent :

- 1,2 à 4 mg de morphine,
- 2,2 à 2,8 mg de norcodéine,
- 10,7 à 11,7 mg de codéine liée,
- 1,5 à 3,7 mg de codéine libre.

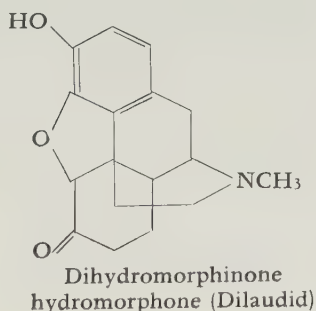
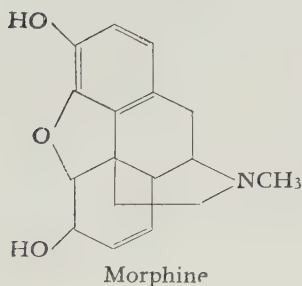
Après ce bref résumé concernant le métabolisme de la morphine et de la codéine, nous avons rappelé les principaux caractères du Dilaudid et de l'Eukodal et les travaux antérieurs traitant du métabolisme et de l'élimination de ces deux produits. Nous avons ensuite exposé nos expérimentations, discuté les résultats obtenus et dégagé les conclusions à tirer de l'ensemble de ce travail.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES ET TRAVAUX ANTERIEURS

I. — CHLORHYDRATE D'HYDROMORPHONE

L'hydromorphone est la dihydromorphinone. La thérapeutique, ailleurs qu'en France, utilise son chlorhydrate sous le nom déposé de DILAUDID, de formule $C_{17}H_{19}O_3N \cdot ClH$.



Dans sa structure, on peut remarquer comme dans celle de la morphine, la présence d'une fonction phénol en 3, qui explique ses caractères de solubilité dans les alcalis. D'autre part, nous voyons en 6 une fonction cétone à la place de la fonction alcool qui permettra de distinguer l'hydromorphone de la morphine, et la suppression de la double liaison 7-8.

Propriétés physiques et chimiques.

Le chlorhydrate d'hydromorphone se présente sous la forme d'une poudre blanche, de poids moléculaire 321,79, cristalline, soluble dans l'eau et dans l'alcool, insoluble dans l'éther. On l'obtient par réduction de la morphine en dihydromorphine et oxydation de cette dernière [14, 65, 66, 129].

Il réagit avec les réactifs généraux des alcaloïdes (Dragendorff), avec les réactifs de FROEHDE, LAFON et MARQUIS ; il donne aussi la réaction au ferricyanure ferrique.

Pharmacologie.

Comme la morphine, le chlorhydrate d'hydromorphone est un analgésique puissant. Son action analgésique plus rapide, mais de moins longue durée que celle de la morphine [26], est selon les méthodes utilisées pour l'étudier, de trois à seize fois plus élevée [34, 37, 52, 60, 63, 69, 102, 103]. Mais s'il s'est révélé plus actif, il est aussi beaucoup plus toxique, en particulier par son action dépressive sur le centre respiratoire qui est nettement plus forte [32, 33, 34, 55, 77, 82, 102, 103, 125, 143]. La dose létale 50 % (DL 50) par injection intraveineuse chez la souris [17] est, selon les conditions d'expérimentation, de 61 à 96 mg/kg, ce qui correspond à 3 à 6 fois la toxicité de la morphine.

— Action sur le tube digestif :

Parallèlement à son pouvoir analgésique, le Dilaudid inhibe davantage et plus rapidement le péristaltisme intestinal par élévation du tonus, mais combat mieux que la morphine le spasme intestinal post-opératoire [36, 54, 58, 90, 116]. Il est par contre moins constipant [26, 32, 99, 125]. Contrairement à la morphine, il n'a aucune activité sur la sécrétion gastrique tant en acidité

qu'en quantité [93]. Enfin, un avantage certain sur la morphine, c'est son moindre pouvoir émétisant. Les nausées, vomissements apparaissent moins fréquemment et seulement à des doses élevées [26, 32, 125].

— *Actions secondaires :*

L'euphorie est moins élevée qu'avec la morphine [120], les vertiges plus rares [26]. L'action sur la température, le système cardiaque, la pression sanguine [26, 71, 72], la coagulation [85, 86] est en général très faible. De même la diurèse et le tonus des sphincters sont peu influencés par l'administration de chlorhydrate d'hydromorphe aux doses thérapeutiques [19, 53].

Enfin, l'hydromorphe n'entraîne aucune modification du nombre des éosinophiles [105].

Sur l'utérus, lors de son administration, on observe une diminution de la fréquence et de la force des contractions, ces effets diminuant avec l'évolution de la grossesse, pour devenir nuls près du terme [95].

Mentionnons enfin son action antitussive comparable à celle de la morphine [62].

— *Accoutumance et toxicomanie :*

L'étude de l'accoutumance et de la toxicomanie engendrées par les dérivés de la morphine a été faite sur le singe qui paraît être l'animal le plus apte à cette expérimentation [118]. L'hydromorphe résultait des nombreux travaux de chercheurs dont le but était de trouver des corps voisins de la morphine, d'activité analgésique identique, mais n'entraînant pas d'accoutumance. Aussi, lors de sa présentation au corps médical, le chlorhydrate d'hydromorphe était considéré comme n'entraînant pas d'accoutumance. Les applications cliniques de ce médicament et les expérimentations de laboratoire ont montré très vite que, lors de l'administration répétée du produit, l'habitude et le besoin appa-

raissent, mais légèrement plus lentement qu'avec la morphine [92, 113, 117, 119]. Le danger d'accoutumance existe donc et on retrouve les phénomènes classiques d'abstinence.

Indications thérapeutiques.

Le Dilaudid employé seul ou souvent associé à l'atropine, le paralysant du vague le plus utilisé, agissant comme spasmolytique et par suite contre l'élévation du tonus des sphincters et limitant la sécrétion salivaire, a de nombreuses applications. Il est utilisé surtout en Allemagne. On l'emploie en général dans tous les états douloureux. Son action analgésique apparaît 10 à 15 minutes après l'administration par voie sous-cutanée et persiste pendant 8 heures, le maximum de l'activité se situant entre la première et la troisième heure [11, 81].

Voici un bref résumé de ses principales applications :

— Utilisation en pathologie interne :

Coliques hépatiques [83], coliques néphrétiques [83], infarctus du myocarde, angine de poitrine [144], cancer, tabes [56], embolie pulmonaire [61].

— Utilisation en prémédication :

Le Dilaudid peut être utilisé en prémédication dans toutes les interventions chirurgicales nécessitant une anesthésie [30, 64, 109].

— Utilisation post-opératoire :

Dans les douleurs résultant des interventions chirurgicales [81].

— Utilisation en obstétrique :

On peut employer ce dérivé associé à la scopolamine lors des accouchements pour la suppression des douleurs [126, 139].

Antidote.

Nous avons vu que comme la morphine ce dérivé est très toxique. Les effets fâcheux qui, par un surdosage involontaire, ont été déclenchés (dépression respiratoire, spasme intestinal...) peuvent être atténués par administration de N-allyl-normorphine [23, 59, 70, 79, 111, 146].

Posologie.

Les doses à ne pas dépasser sont de 4 mg en une prise et 12 mg par jour.

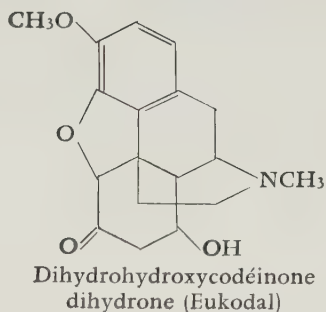
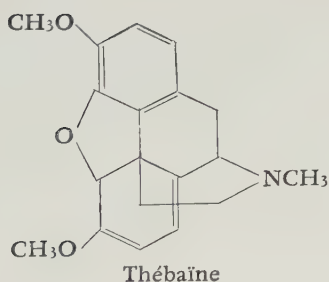
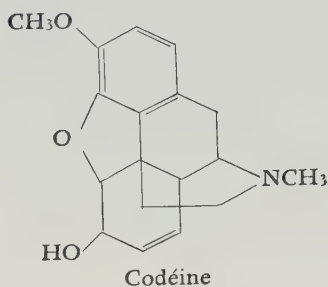
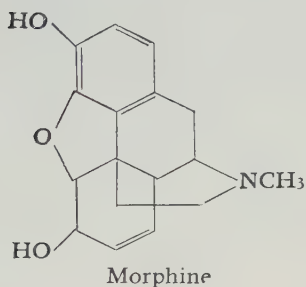
On l'utilise par voie buccale sous forme de tablettes dosées à 0,0025 g ou par voie sous-cutanée (ampoules contenant 0,002 g de Dilaudid) à raison de 2 à 5 mg par jour chez l'adulte, associé ou non à l'atropine suivant le but recherché [65, 66, 129]. Chez l'enfant, il doit être employé avec prudence, toujours à très faible dose et qu'en cas de nécessité absolue. Chez le nourrisson, comme la morphine il est totalement déconseillé.

Contre-indications.

Le chlorhydrate d'hydromorphone est contre-indiqué chez les asthmatiques. Son utilisation chez les malades de l'appareil respiratoire (tuberculose, pneumonie...) doit aussi être prudente.

II. — CHLORHYDRATE DE DIHYDRONE

La dihydrone est la dihydrohydroxycodéinone ou dihydro-oxycodéinone.



En thérapeutique, on utilise le chlorhydrate de dihydrone, en Allemagne sous le nom initial d'Eukodal, en France sous le nom déposé d'Eubine.



PM : 405,87.

La dihydrone a été préparée pour la première fois par Martin FREUND en 1917. On la prépare à partir de la thébaïne [43, 44].

Propriétés physiques et chimiques.

Le chlorhydrate de dihydrone se présente sous la forme d'une poudre blanche, cristallisée, amère (point de fusion : 270° C). Il est soluble dans 6 parties d'eau et 60 parties d'alcool à 90° [14, 65, 66, 129]. La structure chimique de la dihydrone accuse une certaine analogie avec la morphine et la codéine, mais aussi des différences caractéristiques qui constituent les divergences en matière physiologique et pharmacologique. Il faut remarquer la suppression de la fonction phénol qui interviendra dans les caractères de solubilité de la base et la présence d'une fonction cétone en 6 d'une part, et d'une fonction alcool secondaire en 8 d'autre part.

Pharmacologie.

Le chlorhydrate de dihydrone (Eukodal) est un narcotique et un analgésique puissant [34, 60, 102]. Employé comme succédané de la morphine, il est cependant moins toxique. En effet, son action déprimante sur le centre respiratoire quoique marquée, est inférieure à celle de la morphine [14, 34, 103, 104, 137]. De plus, aux doses thérapeutiques, il produit peu ou pas les effets secondaires fâcheux de cette dernière, tels que vertiges, vomissements, torpeur, céphalées et sueurs [39, 39 bis, 89, 104]. Sur le tube digestif, son action est peu marquée, tout au moins aux doses thérapeutiques [98].

Enfin, le chlorhydrate de dihydrone n'influence le système cardiovasculaire que d'une façon négligeable [98].

Par contre, son administration à des doses répétées entraîne une accoutumance, mais cette dernière apparaît beaucoup plus lentement que dans le cas de la morphine [7, 31, 54, 84, 136, 145]. D'où sa réglementation

tion dans les pays où il est utilisé [46, 96] ; en France, ce produit est classé au tableau B (Codex 1949).

Une propriété importante de la dihydrone est à signaler : son activité acétylcholinomimétique rappelant l'ésérine et étudiée tout particulièrement par G. DASTUGUE, de l'école clermontoise [25].

Mentionnons aussi son activité antitussive. Cette action étudiée par les méthodes habituelles s'est révélée bien supérieure à celle de la codéine [45, 108], d'où son utilisation en Allemagne dans les préparations contre la toux.

Il faut noter un cas d'intolérance à l'Eubine cité par DESOILLE [28] chez une ouvrière travaillant à sa fabrication.

Indications thérapeutiques.

Le chlorhydrate de dihydrone a surtout fait ses preuves en tant qu'analgésique en cas de douleurs vives. Son action est supérieure à celle de la morphine quant à la rapidité avec laquelle débute l'action et quant à l'intensité et la durée de l'action analgésique [60, 69, 103, 145].

On l'emploie principalement :

— *En pathologie interne :*

Coliques néphrétiques et hépatiques [14, 68, 123], crises gastriques [78], accès d'angine de poitrine et d'asthme cardiaque [123], maladies incurables (phase terminale du cancer) [14, 68].

L'action analgésique se manifeste au bout de 8 à 10 minutes et persiste plusieurs heures (injection par voie sous-cutanée).

De plus, ce médicament est indiqué pour l'apaisement

des fortes irritations tussigènes lorsque d'autres remèdes ont échoué [12, 54, 65, 114].

— *En chirurgie :*

Il est utilisé dans les soins préparatoires de l'anesthésie générale ou locale, employé seul ou associé à la scopolamine, et en administration post-opératoire [145].

Antidote.

Comme pour tous les dérivés de ce type, la N-allyl-normorphine semble être le remède de choix pour les intoxications dues à ce médicament. Elle en atténue les accidents fâcheux tels que dépression respiratoire, phénomènes circulatoires... [110].

Posologie.

On l'emploie par voie buccale et sous-cutanée à la dose de 0,005 à 0,020 grammes par jour en prise de 0,005 grammes [14,65].

Doses maxima : 0,03 g en une fois.
0,10 g en 24 heures.

III. — TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA DETECTION, L'IDENTIFICATION, LE DOSAGE DE L'HYDROMORPHONE ET DE LA DIHYDRONE ET SUR LEURS METABOLISMES

FREISCHMANN en 1936 [47], étudiant l'activité pharmacologique du Dilaudid chez le chien, en injectant des doses massives, rechercha le toxique dans les selles et les urines de l'animal. L'auteur, extrayant les urines après leur dessiccation par le chloroforme en milieu ammoniacal, retrouva la base après de nombreuses purifications. De même dans les selles, il put mettre en évidence la présence du toxique.

L'excrétion de la dihydrone a aussi été étudiée en 1934 chez le chien par SCHÜBEL [115] qui put, après l'injection sous-cutanée du produit, retrouver 12 % de la dose injectée dans les urines, le toxique étant retrouvé à l'état libre.

Ces travaux portaient sur des quantités énormes de toxique, aussi était-il nécessaire d'adapter des techniques sensibles de détection et de dosage à l'étude de ces dérivés utilisés à des doses très faibles, comme celles employées en clinique. Des techniques modernes d'identification et de dosage, chromatographie sur papier [1, 18, 73, 74, 76, 122, 132, 133, 135], polarographie [75], photométrie [27], spectrophotométrie [15, 67, 131], électrophorèse [112, 124, 135, 138] et tout dernièrement chromatographie en couche mince [24] furent utilisées tant pour le contrôle des produits commercialisés que pour la détection dans les urines.

Le deuxième but de ces méthodes, c'est-à-dire l'identification de l'hydromorphone et de la dihydrone dans les urines présente en effet un très grand intérêt en

médecine légale. Dans ce domaine, c'est surtout la chromatographie qui a apporté le plus de satisfactions. Des techniques très sensibles ont été mises au point en particulier par JATZKEWITZ [74], pour la détection dans les urines de toute une série de médicaments (Morphine, Dilaudid, Eukodal, Acedicon, Dicodid...).

Les doses retrouvées sont en général très faibles et parfois des expertises donnent des résultats négatifs dans des cas où l'utilisation de ces toxiques par le sujet à examiner est suspectée. Nous avons essayé d'expliquer ce fait. En effet, toutes ces méthodes recherchent le toxique sous sa forme d'administration, c'est-à-dire sous forme libre dans les urines. Or, nous avons vu que de nombreux toxiques s'éliminent un peu sous leur forme d'origine, mais surtout sous forme conjuguée, en particulier sous forme de conjugué glycuronique.

Aussi dans notre étude avons-nous tenté de mettre en évidence cette forme d'excrétion qui nous paraît être une forme très générale d'élimination pour les toxiques hydroxylés.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

I. — METABOLISME ET ELIMINATION DE L'HYDROMORPHONE (DILAUDID) CHEZ LE CHIEN

Pour suivre ce métabolisme dans l'organisme du chien nous avons d'abord dosé puis identifié l'alcaloïde dans les divers organes et produits d'excrétion après avoir sacrifié l'animal.

1° METHODES DE DOSAGE

Nous nous sommes proposé de confronter la méthode classique de STASS-OTTO, OGIER et KOHN-ABREST [103 bis] et la méthode de M. et P. CHAMBON [21] inspirée de celle de Woods [16, 141]. La première permet de retrouver tous les toxiques courants, la deuxième s'adresse particulièrement à la morphine et à ses dérivés.

A. — Méthode de M. et P. CHAMBON.

Cette méthode, qui est une adaptation de celle de Woods, va nous permettre d'extraire et de doser soit l'alcaloïde total, c'est-à-dire l'alcaloïde sous forme libre et sous forme liée, soit le toxique libre uniquement.

Cette technique prévue initialement pour la morphine est parfaitement valable pour l'hydromorphone.

Technique de séparation et dosage de la morphine.

Réactifs :

— Acide trichloracétique libre et en solution à 20 p. 100.

— Chloroforme pur, lavé et distillé extemporanément.

— 1, 2 - dichloréthane lavé, séché, redistillé $E = 83^{\circ}5$.

— Réactif avec chlorure de p-nitrobenzoyle 2 g dans 100 de dichloréthane ; à préparer extemporanément.

— Tampon borate pH 9 : acide borique 48 g, OHNa 15 g dissous dans H_2O , q.s.p. 1 litre.

— Tampon phosphate pH 5 : Phosphate disodique 3,5 g, phosphate monopotassique 132,7 g, H_2O Q.S.P. 1 litre.

— Solution acide borique 0,5 M : acide borique 3,09 g/100 ml.

— Réactif Méthyl-orange : dissoudre à chaud 500 mg méthylorange dans 100 ml eau, et filtrer à chaud. Agiter 3 fois la solution avec V.E. de chloroforme pur et lavé. Avant usage diluer 0,5 ml de cette solution stock avec V.E. sol. acide borique 0,5 M.

TECHNIQUE : 1° Déprotéination extractive.

Prise d'essai : au cours d'une expertise, ne comportant pas d'orientation très précise, il apparaît nécessaire, malgré la très grande sensibilité de la méthode, d'opérer avec des prélèvements relativement importants qui pourront être de l'ordre de 20 ml urine, 2 à 3 ml bile, 10 g tissu rénal ou hépatique.

Les tissus broyés avec éventuellement des appareils spéciaux ou plus simplement au mortier avec du sable lavé et incinéré et en présence d'acide ClH 0,5 N, 9 vol.

sont amenés à l'état de bouillie homogène dont par centrifugation, on sépare la phase aqueuse. Cette solution aqueuse extractive est additionnée du 1/10^e de son poids d'acide trichloracétique que l'on fait dissoudre, homogénéisée et soumise à centrifugation. On sépare ainsi la solution acide alcaloïdique et privée des protéines.

L'urine est de la même façon additionnée du 1/10^e de son poids d'acide trichloracétique, homogénéisée, centrifugée.

La bile est déprotéinée par addition de 5 vol. de solution d'acide trichloracétique à 10 p 100 et centrifugée.

2° Séparation des bases non morphinoïdes.

L'éventualité de l'administration thérapeutique de médicaments aussi banals que la codéine ou autres sédatifs de la toux de la série du morphinan, et à fonction phénolique bloquée, invite à les séparer préalablement, autant pour leur identification, que pour éviter des interprétations ultérieurement plus difficiles. Une expérimentation prolongée qui sera publiée autre part nous ayant démontré le rôle déterminant joué dans la production artificielle de l'oxydimorphine par l'alcalinité sodique ou potassique, nous avons pu nous rendre compte qu'il est possible de séparer, sans inconvénients de cet ordre, et en milieu ammoniacal, la morphine et la codéine ou l'eukodal.

Les solutions trichloracétiques déprotéinées précédentes sont alcalinisées nettement par l'ammoniaque, au rose soutenu de la phénolphthaléine, et la solution est épuisée à 2 reprises avec le chloroforme purifié, puis avec du benzène fraîchement distillé.

Ces solvants réunis, pourront ensuite servir à la recherche d'autres alcaloïdes.

3° *Hydrolyse chlorhydrique de la morphine « liée ».*

La solution aqueuse précédemment épuisée, est neutralisée par l'acide chlorhydrique, et additionnée du 1/10^e de son volume de ClH conc. et chauffée à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes.

La solution hydrolysée, additionnée de 3 p 100 d'acide trichloracétique, est centrifugée. Le culot est lavé avec quelques ml de solution d'acide trichloracétique à 10 p 100 et les liquides centrifugés réunis sont soumis à un nouvel épuisement par le chloroforme d'abord, puis par le benzène de façon à éliminer les produits d'hydrolyse non basiques, acides ou phénoliques que l'expertise peut avoir à considérer.

4° *Séparation de la morphine.*

La morphine totale ainsi libérée est extraite de sa solution, non point par l'acétate d'éthyle recommandé par Woods qui exige des quantités considérables de solvant, mais en nous inspirant du travail de GUYOT, c'est-à-dire après alcalinisation par le bicarbonate de sodium en excès, par le chloroforme en milieu alcoolique à 30°.

La solution morphinique est donc additionnée d'alcool à 95° dans la proportion de 33 vol. pour 73 vol. de sol. d'hydrolyse, et par addition très progressive de CO₃HNa pulvérisé, d'abord neutralisée puis encore additionnée d'un léger excès. Cette liqueur est épuisée avec soins par 3 fois 10 à 20 ml de chloroforme purifié.

Les extraits chloroformiques réunis et centrifugés ou éventuellement filtrés sont soumis à concentration, par distillation sous pression réduite, à environ 5 ml.

Cet extrait chloroformique est épuisé à 2 reprises par agitation avec chaque fois 5 ml ClH N/2. Ces solutions chlorhydriques réunies, centrifugées sont débarrassées de la couche organique.

Une partie aliquote de cette solution de l'ordre de 1 à 2 ml sera réservée aux essais de chromatographie sur papier phosphaté selon MUNIER par le butanol-eau à saturation.

5° *Estérification et complexation selon Woods.*

Verser dans une petite ampoule à décantation 5 ml de la solution chlorhydrique précédente, ajouter 1 ml solution de sulfite acide de sodium à 40 % ; neutraliser avec 2 à 3 gouttes de solution de NaOH à 43 %. Rapidement ajouter 10 ml de réactif au chlorure de p. nitrobenzoyle à 2 % dans le dichloréthane et 1 ml solution NaOH à 43 %.

Agiter 40 minutes à la machine à agiter. Passer le mélange dans une ampoule à décantation ou centrifuger et rejeter la couche aqueuse superficielle. Laver la phase organique par agitation avec 5 ml tampon borate pH 9 pendant 1 minute et éliminer la phase aqueuse.

Laver encore la phase organique par agitation 1 minute avec 5 ml tampon phosphate pH 5 et séparer toujours quantitativement la phase organique contenant l'ester p. nitrobenzoïque de la morphine.

La phase organique, placée dans une petite ampoule à décanter, est additionnée de 0,5 ml de solution réactif de méthylorange et agitée énergiquement pendant 10 minutes.

Séparer parfaitement la phase organique, qui a pu se teinter en orangé, dans un tube à centrifuger, et après centrifugation éliminer avec soin par aspiration toutes traces de la solution aqueuse de méthylorange. Filtrer encore la solution organique du complexe sur un fragment de coton hydrophile desséché, destiné à éliminer complètement toute trace de solution aqueuse.

La solution du complexe p.nitrobenzoylmorphine-méthylorange dans le dichloréthane, pourra être utilement

examinée au spectrophotomètre, et s'il est nécessaire par dilution dans le dichloréthane. Une partie aliquote sera mise en réserve pour chromatographie.

La fraction restante (5 ml) de la solution organique du complexe est versée dans une petite ampoule à décanter et agitée énergiquement, pendant 5 minutes, avec 4 ml ClH N/1. La solution aqueuse se colore en rouge violacé plus ou moins intense, correspondant à la dissociation du complexe et à la libération du méthylorange. La phase organique retient la majeure partie de l'ester morphinique.

Séparer quantitativement la solution aqueuse colorée de méthylorange. Lire la densité optique à 515 m μ , à la rigueur avec un photomètre muni d'un écran convenable et à une dilution appropriée à la mesure précise.

6° Etalonnage de la courbe de spectrophotométrie.

La multiplicité des opérations décrites entraîne d'inévitables pertes. Il en résulte que pour obtenir un dosage correct, une courbe étalon des rapports densité optique des solutions résiduelles de méthylorange/concentration morphine doit être établie par points successifs. Les prises d'essais correspondantes, échelonnées entre 3 et 20 microgrammes subissant toutes les opérations d'extraction, estérification, complexation. Il va sans dire que un témoin est effectué, sans morphine, et mesure la qualité des réactifs et des manipulations.

La technique appliquée dans son ensemble nous permet de retrouver l'hydromorphone totale. Comme pour la morphine, l'hydromorphone libre peut être recherchée selon le même protocole en supprimant la phase d'hydrolyse à l'autoclave. Dans ce cas, le filtrat trichloracétique de déprotéinisation provenant des tissus ou des liquides biologiques en expertise, après addition d'un excès de bicarbonate de sodium, puis d'alcool pour

réaliser un titre voisin de 30°, est épuisé par le chloroforme [21]. A cet extrait qui contient l'alcaloïde libre, on fait subir les différentes opérations prévues dans les paragraphes 4 et 5 de la technique précédente.

Nous avons fait une courbe d'étalonnage pour l'hydromorphe, à partir du chlorhydrate cristallisé dissous dans l'eau distillée à laquelle nous avons ajouté un peu d'acide chlorhydrique (3 gouttes de HCl N pour 100 ml). Cette solution contenant 10 mg/ml conservée au réfrigérateur nous permet de faire un témoin pour chaque détermination.

**Valeurs de la densité optique
en fonction de la concentration en Dilaudid**

Chlorhydrate d'Hydromorphe	Densité optique *
2,5 microgrammes	48
5	100
7,5	146
10	204
15	291
20	408
25	495

* Densité optique mesurée au *Spectrophotomètre électronique Jobin-Yvon*.

Nous obtenons ainsi pour l'étalonnage un tracé parfaitement rectiligne (voir page ci-contre).

B. — Méthode de STASS-OTTO et OGIER.

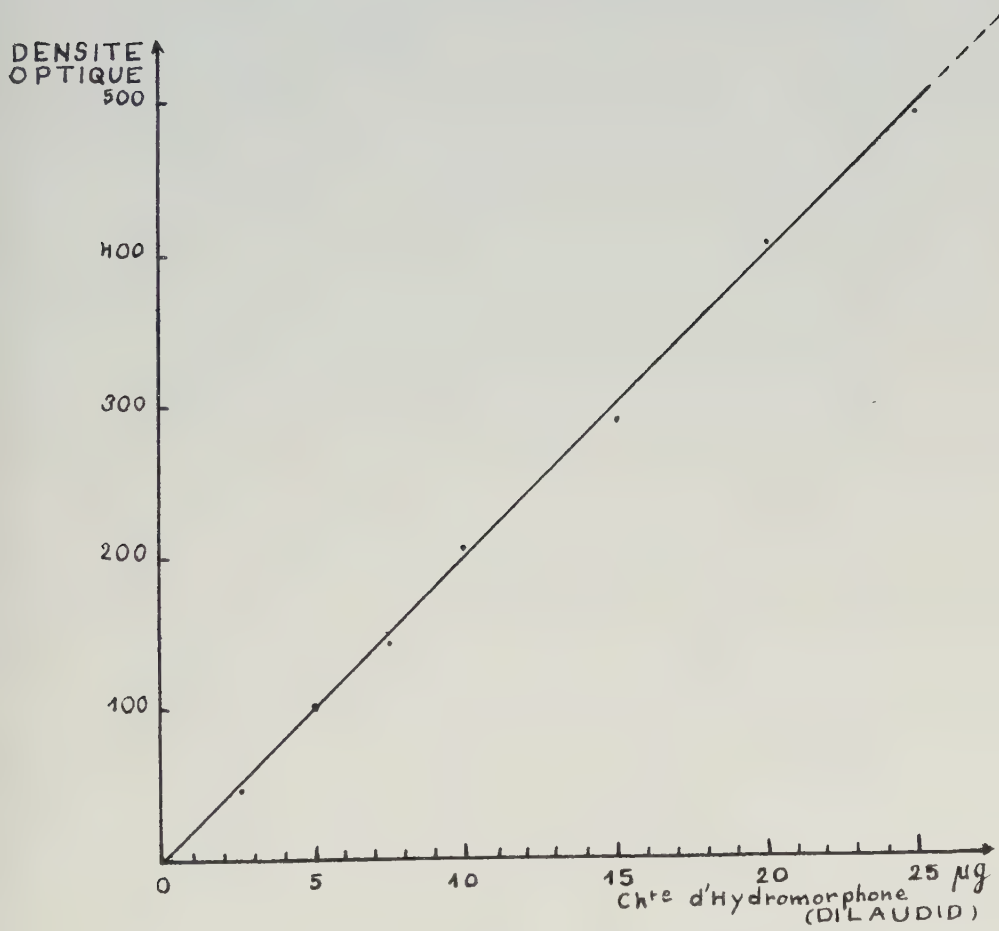
Dans cette méthode, les produits biologiques après broyage à l'aide de sable calciné et lavé subissent une macération alcoolique et tartrique, puis une série de purifications successives par précipitation par l'alcool, filtration et distillation. L'alcool est ensuite éliminé complètement par distillation et le produit obtenu est épuisé à différentes reprises par plusieurs solvants :

— premièrement par l'éther de pétrole en milieu acide qui est destiné à éliminer les matières grasses et résineuses ;

— puis par l'éther éthylique en milieu acide toujours qui extrait les acides organiques, les phénols, les anhydrides d'acide, les glucosides, etc. ;

— enfin par le chloroforme en milieu alcalin : pour cela, après les extractions précédentes, nous passons en milieu alcalin (coloration bleue de l'indicateur B.R.P.) par addition de bicarbonate de sodium et ajoutons 30 % d'alcool à 90 % au produit à épuiser. Cette modification de la méthode classique (extraction par le chloroforme et non par l'éther en milieu alcalin) a pour but de faciliter l'extraction de l'alcaloïde. On renouvelle l'épuisement plusieurs fois et les solutions chloroformiques sont réunies et évaporées à quelques millilitres. La solution restante est alors épuisée par 2 fois 5 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N.

Sur cette solution chlorhydrique, on effectue le dosage de l'alcaloïde selon le protocole exposé dans le paragraphe 5 de la méthode de M. et P. CHAMBON. Nous obtenons ainsi la quantité d'alcaloïde libre.



Courbe d'étalonnage du chlorhydrate d'hydromorphone.

Nous avons alors essayé de voir si l'on pouvait retrouver l'alcaloïde conjugué dans le liquide résultant de l'extraction dans la méthode de STASS. Pour cela, le liquide restant (queue de la méthode de STASS) est neutralisé, puis additionné du 1/10^e de son volume d'acide chlorhydrique concentré et passé à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes. Cette opération a pour but d'hydrolyser les conjugaisons. On peut alors extraire par le chloroforme alcoolique, le produit d'hydrolyse après neutralisation et alcalinisation par le bicarbonate de soude en poudre.

L'alcaloïde ainsi isolé est ensuite dosé par la même technique. Nous obtenons par ce processus le toxique qui se trouvait à l'état conjugué.

Nous verrons qu'il est possible, par cette deuxième étape, de retrouver en partie les résultats donnés par la technique de Woods modifiée.

2° DOSAGE DE L'HYDROMORPHONE CHEZ LE CHIEN N° 1

Nous avons pris un chien mâle, de 3 ans environ, pesant 19,500 kg, et nous lui avons injecté par voie sous-cutanée 40 mg de chlorhydrate de dihydromorphine (soit 2,05 mg/kg) à 9 h. 30.

L'animal une fois injecté est placé dans une cage dont le fond est aménagé de manière à pouvoir recueillir les urines. Le chien est seul dans sa cage, au calme, avec de l'eau à volonté, mais sans nourriture. Nous sacrifions l'animal à 18 h. 30 (c'est-à-dire 9 heures après l'injection) par saignée de la veine fémorale après anesthésie à l'éther.

Signalons que le chien n'a pas uriné entre le moment de l'injection et la mort.

On recueille alors les différents viscères et liquides biologiques :

— le sang : 1050 g ;

— le foie : 370 g ;

— les reins : 83 g ;

— la vessie : 407 g ; pour cela, on prend soin, avant de la prélever, de ligaturer l'urètre pour prévenir toute perte d'urine. Nous obtenons ainsi 366 g d'urine.

— La vésicule biliaire 26 g. Là encore, on ligature le canal cystique sur l'animal avant le prélèvement de la vésicule. Nous sommes alors sûrs d'avoir la totalité de la bile ; poids de bile : 20,4 g.

— L'estomac. Avant le prélèvement, mêmes précautions : le cardia et le pylore sont solidement ligaturés pour conserver tout le contenu de l'estomac.

Lors du dosage, on recueille le contenu et rince la paroi stomacale avec de l'eau distillée chlorhydrique (10 gouttes d'acide chlorhydrique N pour 100 ml d'eau distillée).

Le contenu et les eaux de lavage sont réunis : poids total : 180 g.

— L'intestin, dont on ligature les extrémités, est aussi prélevé. Le contenu et les eaux de lavage ont un poids de 560 g.

Tous les prélèvements sont conservés en attendant les dosages au réfrigérateur à + 4° en flacons bouchés.

Les dosages de l'hydromorphone dans l'urine, la bile et l'estomac sont commencés environ 48 heures après la mort de l'animal. Les autres dosages s'échelonnent sur deux mois. Nous verrons que ce faible espace de temps qui sépare la mort et le moment des dosages est suffisant pour qu'un début d'hydrolyse des formes conjuguées se produise.

Nous pouvons ainsi résumer les résultats trouvés dans le tableau ci-contre.

Tous les résultats, exprimés en chlorhydrate d'hydromorphone, pour un organe ou liquide biologique, se rapportent à l'ensemble de chacun des prélèvements.

Quels sont les commentaires qu'il faut tirer de cette série de résultats résumés dans le tableau précédent ? Ils sont de deux ordres.

Premièrement, il faut remarquer que la méthode préconisée par M. et P. CHAMBON est tout à fait révolutionnaire dans la recherche toxicologique de cette série de toxiques. En effet, il est évident que par la méthode classique de STASS-OTTO et OGIER, les résultats seraient très faibles. Si nous prenons la colonne du tableau concernant la dihydromorphinone libre dosée par cette méthode, cette colonne correspond en fait aux seuls résultats qu'on trouverait en pratiquant cette méthode classiquement : le bilan serait de 34 μg dans la bile, 1620 μg dans les urines et 41 μg dans le foie, le reste des autres organes nous donnant des résultats pratiquement nuls, ce qui correspond à un total de 1695 μg . La méthode de M. et P. CHAMBON nous donne un bilan de 7,253 mg, chiffre évidemment sans comparaison avec le précédent.

Donc, première conclusion à tirer : la méthode de STASS-OTTO, tout en gardant sa valeur dans la recherche systématique des toxiques organiques, reste insuffisante lors de la recherche de cette série de toxiques et d'autres composés peut-être, car il semble se préciser que ce mode d'élimination sous forme conjuguée, correspondant à un mode de détoxication, soit très général. D'où la nécessité de compléter la méthode classique par une phase d'hydrolyse, ou mieux encore d'effectuer parallèlement à cette méthode une recherche spécifique de

Résultats pour le chien n° 1

Dose injectée : 2,05 mg/kg (soit 40 mg de chlorhydrate d'hydromorphone).

Mort 9 heures après l'injection.

ORGANES ou LIQUIDES BIOLOGIQUES Poids total			Méthode de CHAMBON			Méthode de STASS	Méthode de CHAMBON après hydrolise des liquides résiduaux déjà épuisés selon STASS	
			DL *	DC *	DT *		DL	DC
Analyse 48 h. après la mort	{	Bile 20,4 g	** 58	3 908	3 966	34	2 448	2 482
		Urines 366 g	1 493	1 288	2 781	1620	776	2 396
		Estomac 300 g	traces	25	25	traces	58	58
Dosages échelonnés sur deux mois	{	Intestins 560 g	112	262	374			
		Reins 83 g	traces	15	15	traces	traces	
		Sang 1050 g	12	26	38	traces	traces	
		Foie 370 g	32	22	54	41	30	71

Méthode Chambon — BILAN : 7,253 mg ce qui correspond à 18,1 % de la dose injectée.

* DL = Dihydromorphinone libre.

* DC = — conjuguée.

* DT = — totale.

** Les résultats sont exprimés en microgrammes.

cette série des hypnotiques analgésiques par la méthode de Woods modifiée.

Deuxième série de remarques, sur le toxique lui-même : nous voyons en effet dans cette expérience où l'animal est sacrifié 9 heures après l'injection, qu'il est possible de retrouver l'hydromorphone disséminé dans tout l'organisme et sous deux formes, une forme libre et une forme liée, cette dernière en représentant la majeure partie.

D'autre part, nous remarquons que dans la bile où nous retrouvons beaucoup d'alcaloïde (3966 μ g), celui-ci est presque exclusivement sous forme liée (3908 μ g), ce qui tend à nous faire penser au rôle actif du foie dans l'élaboration de cette conjugaison. Enfin, nous constatons que l'élimination de l'hydromorphone se fait pour la majeure partie dans les urines ; le toxique s'y trouvant sous les deux formes. Une petite partie s'élimine aussi dans les fèces.

3° DOSAGE DE L'HYDROMORPHONE CHEZ LE CHIEN N° 2

Nous avons pris un chien mâle de 19,500 kg auquel nous avons injecté à 18 heures, par voie sous-cutanée, une dose de 60 mg de chlorhydrate de dihydromorphine (DILAUDID) soit 3,07 mg/kg.

L'animal est placé dans une cage au calme, avec de l'eau à volonté.

Le chien est sacrifié le lendemain matin à 10 heures, soit 16 heures après l'injection, par saignée de la carotide après anesthésie à l'éther. Là encore, le chien n'a pas uriné entre le moment de l'injection et la mort. On recueille successivement et toujours avec les mêmes

soins que précédemment pour éviter toute perte éventuelle :

Sang : 1050 g.

Vessie contenant 530 g d'urine.

Vésicule biliaire contenant 12 g de bile.

Foie : 500 g.

Reins : 69 g.

Intestins (contenu + eau de lavage = 273 g).

Estomac (contenu + eau de lavage = 700 g).

Les viscères une fois prélevés sont conservés en flacons bouchés au réfrigérateur à + 4°. Pour éviter toute hydrolyse éventuelle des dérivés de conjugaisons, nous avons commencé le dosage du toxique libre dans la bile et dans l'urine, 4 heures après la mort de l'animal.

Nous obtenons les résultats résumés dans le tableau page 50.

Conclusion : nous avons employé ici uniquement la méthode de M. et P. CHAMBON, qui nous donne, comme nous l'a montré la première expérience, des résultats très supérieurs à la méthode classique. Si nous comparons ce tableau au précédent (voir page 47), nous remarquons plusieurs faits. Là encore, nous retrouvons le toxique disséminé dans l'organisme et sous deux formes. Mais nous avons de très nettes divergences avec les résultats précédents ; en fait, nous avons injecté une dose supérieure (60 mg au lieu de 40), mais ce qu'il faut surtout souligner, c'est que dans cette dernière expérience, l'espace qui sépare le moment de l'injection et la mort est beaucoup plus long : dans le premier cas, 9 heures ; dans le deuxième, 16 heures.

Il est bien évident que pendant cet espace de 16 heures, le métabolisme a dû se poursuivre et c'est ce qui

Résultats pour le chien n° 2

Dose injectée 3,07 mg/kg (soit 60 mg de chlorhydrate d'hydromorphone).

Mort 16 heures après l'injection.

ORGANES ou LIQUIDES BIOLOGIQUES			Méthode de CHAMBON		
Poids total			DL	DC	DT
			*		
Analyse immédiate	{ Bile	12 g	0	348	348
	{ Urines	530 g	1 060	12 355	13 415
Analyse échelonnée sur un mois et demi	{ Estomac	700 g	126	504	630
	{ Foie	500 g	203	95	298
	{ Intestins	273 g	232	587	819
	{ Sang	1 050 g	0	144	144
	{ Reins	69 g	86	48	134

Total : 15,788 mg ce qui correspond à 26,3 % de la dose injectée.

* Les résultats sont exprimés en microgrammes.

explique les différences entre les résultats des deux tableaux. En effet, il est probable que dans les premières heures comme pour le premier cas, le toxique disséminé dans l'organisme est conjugué au niveau du foie. Il nous a été possible d'ailleurs de retrouver encore l'alkaloïde dans le foie (298 μg) et dans la bile (348 μg), ce dernier se trouvant dans la vésicule biliaire exclusivement sous forme conjuguée.

La bile étant rejetée dans le tube digestif, nous aurions dû retrouver la majeure partie de l'alkaloïde dans l'intestin. Or, il n'en est rien, on n'y retrouve que 819 μg . Mais dans les urines, nous en décelons en très grande quantité (13415 μg , correspondant à 22,36 % de la dose injectée). Il faut donc penser que le toxique que nous aurions dû retrouver dans l'intestin, est repassé dans le sang par réabsorption intestinale en vue de son élimination par le rein. D'où sa présence en quantité importante dans l'urine, ce qui renforce la théorie du cycle entéro-hépatique.

4° IDENTIFICATION DE L'HYDROMORPHONE DANS LES URINES ET LA BILE CHEZ LES CHIENS N° 1 ET N° 2

Dans le chapitre précédent, nous avons pu doser l'alkaloïde libre et l'alkaloïde lié après sa libération des dérivés de conjugaison existant dans les divers milieux biologiques. Il est maintenant nécessaire de vérifier l'identité de cet alkaloïde, puis de préciser la nature des combinaisons du toxique avec les produits biologiques.

Pour cela, nous allons d'abord isoler le toxique, en préparer ensuite la base, puis caractériser par chromatographie et par des réactions colorées le produit ainsi obtenu.

ISOLEMENT DE L'HYDROMORPHONE LIBRE

Nous avons vu que par la méthode de M. et P. CHAMBON, le dosage des alcaloïdes dans chaque prélèvement se pratique après extraction sur une solution chlorhydrique 0,5 N. Sur le restant de cette solution chlorhydrique, nous allons pouvoir identifier l'hydromorphe.

Méthode : 4 cc de la solution précédente contenant le toxique à l'état de chlorhydrate, sont additionnés de 2 cc d'alcool à 90° et de 5 cc de chloroforme. La solution est agitée puis neutralisée avec de l'ammoniaque diluée au demi, goutte à goutte, jusqu'à réaction alcaline au papier BRP (Codex 1937) : virage au bleu. On ajoute alors deux gouttes d'ammoniaque au demi en plus et on agite vigoureusement pendant 5 minutes environ. On laisse décanter et sépare le chloroforme. Le même traitement est renouvelé deux fois. Les liquides d'épuisement sont réunis et distillés dans le vide au BM à 30-35° ; nous obtenons ainsi la base qui permettra l'identification.

Les différentes bases qui vont servir de témoin pour les réactions colorées et la chromatographie seront préparées de la même manière à partir des chlorhydrates. Nous préparons ainsi comme témoin : la morphine, l'hydromorphe, la N-allyl-normorphine, la codéine et la dihydrone. Lors de cette préparation, il y a lieu de ne pas passer en milieu trop alcalin, car ces bases alcaloïdiques sont en général très sensibles en milieu alcalin à l'oxydation.

Pour plus de sécurité, nous avons mis des témoins supplémentaires : l'aminooxyde de l'hydromorphe, l'aminooxyde de la dihydrone et l'oxydi-hydromorphe.

Pour préparer les aminoxydes [106], nous avons suivi la technique suivante. Les bases hydromorphe et dihydrone préparées à partir de leur chlorhydrate selon la méthode précédemment exposée, sont traitées par leur poids de peroxyde d'hydrogène en solution concentrée (110 volumes). Le mélange est ainsi abandonné une nuit puis évaporé sous pression réduite, à sec. Le résidu est ensuite épuisé par l'éther chaud à deux reprises ; cette opération a pour but d'éliminer la base non attaquée. Puis on dépose sur les bandes à chromatographier le résidu repris par quelques gouttes d'eau distillée.

L'oxydi-hydromorphe est préparée à partir de la base par action sur celle-ci de l'éther contenant des peroxydes en milieu sodique (3 gouttes de soude à 30 % pour 50 cc d'éther). L'ensemble abandonné deux jours est ensuite évaporé à sec sous pression réduite et à faible température. On élimine alors la base restante par épuisement par l'éther. On obtient ainsi un résidu prêt à être déposé sur les chromatogrammes. On reprendra ce résidu par le chloroforme alcoolique pour déposer les spots.

Nous n'avons pu obtenir pour la dihydrone de dérivé, comme pour la morphine ou l'hydromorphe de type oxydi, ce qui vient confirmer le rôle de la fonction phénol dans cette transformation.

Ces témoins ont l'intérêt de nous permettre d'identifier les produits d'altération obtenus lors de l'extraction des toxiques par les solvants organiques au cas où ceux-ci contiendraient des peroxydes [20]. Ces corps perdent complètement les propriétés du produit de départ. Ainsi les aminoxydes perdent le caractère de solubilité dans l'éther de la base. Nous voyons donc qu'il est nécessaire de prendre de très grandes précautions pour le choix et la préparation des solvants organiques, servant aux extractions. Les solvants tels que

le chloroforme, le dichloréthane..., doivent être lavés, séchés et distillés avant leur emploi.

L'éther éthylique utilisé en toxicologie devra toujours être desséché et surtout déperoxydé sur sodium.

CHROMATOGRAPHIE ET REACTIONS COLOREES

La base alcaloïdique à identifier et les bases témoins préparées, vont alors être chromatographiées. Les résidus d'évaporation sont repris par quelques gouttes de chloroforme et déposés sur papier Whatman n° 1 imprégné de solution M/5 de phosphate monopotassique (27,2 g/litre) et séché selon la méthode de MUNIER [97]. Le chromatogramme est alors développé par voie ascendante avec le butanol saturé d'eau à 20° environ. Après une migration de 15 à 17 heures, les bandes vont être révélées à l'aide de divers réactifs.

Pour les spots témoins, on dépose environ 40 μ g pour chacune des bases à 3 cm du bord inférieur.

Les réactifs de révélation utilisés sont :

1. SOLUTION D'IODE :

On prépare une solution d'iode à saturation dans l'éther de pétrole et on révèle les bandes par immersion. Cette méthode utilisée par M. CHAMBON permet d'obtenir des taches brun-jaune très nettes avec les alcaloïdes.

Cette technique de révélation a l'intérêt de donner des taches qui, à la longue, disparaissent et permet ainsi de pouvoir identifier les alcaloïdes par un autre réactif (réactif de Dragendorff, par exemple).

2. RÉACTIF DE DRAGENDORF (formule FRANÇOIS et SEGUIN [41].

La révélation avec ce réactif se fait par pulvérisation.

Elle permet d'obtenir de belles taches rouges sur un fond orange.

3. RÉACTIF DE MARQUIS : révélation par immersion.

La réaction de MARQUIS, très rapide, permet une révélation des taches avant la destruction du papier, car l'apparition de la couleur est instantanée.

— Avec la morphine, nous obtenons une tache rose-rouge virant ensuite au violet-lilas puis au violet foncé.

— Avec la N-allyl-normorphine (Nalorphine) : même réaction.

— Avec l'hydromorphone : coloration jaune initiale passant au brun, puis au violet-lilas.

— Avec la dihydrone : même réaction.

— Avec la codéine, nous obtenons une coloration instantanée violette intense.

4. RÉACTIF DE FROEHDE : révélation par immersion (réaction rapide avant destruction du papier).

— Morphine : coloration lilas.

— N-allyl-normorphine (Nalorphine) : même réaction.

— Hydromorphone : coloration lilas clair.

— Dihydrone : coloration rose très légère.

— Codéine : coloration verte virant au violet lentement.

5. RÉACTIF DE LAFON : révélation par immersion.

— Morphine : vert brun.

— Nalorphine : vert brun.

— Hydromorphone : jaune brun.

— Dihydrone : jaune brun.

— Codéine : vert émeraude.

6. RÉACTION AU FERRICYANURE FERRIQUE adaptée à la révélation sur papier phosphaté par M. et P. CHAMBON [21].

La réaction au ferricyanure ferrique selon la technique courante est gênée par complexation du fer lors de la révélation sur papier phosphaté. M. et P. CHAMBON ont proposé la technique suivante : immersion de la bande dans une solution extemporanée de chlorure ferrique alcoolique (chlorure ferrique 0,20 - alcool absolu 3 - éther exempt de peroxydes 15), puis séchage 1 à 2 minutes et enfin immersion, ou pulvérisation d'une solution extemporanée alcoolique de ferricyanure de potassium. Cette méthode permet de révéler la tache, bleu de Prusse, de l'alcaloïde phénolique.

— Morphine : bleu.

— Nalorphine : bleu.

— Hydromorphone : bleu.

— Dihydrone : O.

— Codéine : O.

7. RÉACTION A LA 2-4 DINITROPHÉNYLHYDRAZINE.

Cette réaction moins classique, permet de différencier l'hydromorphone et la morphine qui, comme nous le verrons, ont pratiquement le même Rf par cette méthode. Pour cela, nous utilisons une méthode employée par VIDIC [134] pour différencier l'hydromorphone de la morphine et la dihydrone de la codéine. VIDIC utilisait la 2-4 dinitrophénylhydrazine en milieu acétique ou trichloracétique qui, avec les cétones, donne une coloration jaune.

Nous utilisons les réactifs suivants :

Réactif n° 1 :

2-4 dinitrophénylhydrazine	0,10 g
ClH 2 N	20 ml

Réactif n° 2 :

NaOH à 10 %.

Méthode : on procède à la pulvérisation du chromatogramme avec le premier réactif : les aldéhydes et les cétones (hydromorphone, dihydrone) donnent une coloration jaune. On laisse sécher puis pulvérise la soude qui intensifie les colorations obtenues.

Il faut remarquer que seules les colorations jaunes obtenues lors de la pulvérisation à la 2-4 dinitrophénylhydrazine et intensifiées par la soude sont valables, car souvent la soude seule révèle des taches non révélées par le réactif précédent : ces réactions secondaires sont sans valeur.

Les résultats obtenus par l'étude chromatographique sont les suivants :

PAPIER WHATMAN N° 1 PHOSPHATÉ

SOLVANT : BUTANOL SATURÉ D'EAU

Morphine base	Rf 0,14
Hydromorphone base	0,14
Dihydrone base	0,17
Nalorphine base	0,38
Codéine base	0,20
Hydromorphone Aminoxyde ..	0,21
Oxydihydromorphone	pas de migration
Dihydrone Aminoxyde	0,65

Les Rf obtenus avec le toxique à identifier dans la bile et dans les urines des chiens n° 1 et n° 2 sont analogues à celui de la morphine et de l'hydromorphone : $R_f = 0,14$ (voir page ci-contre).

Les réactions colorées et notamment la réaction à la 2-4 dinitrophénylhydrazine permettent d'identifier le toxique à l'hydromorphone. Nous n'avons pas constaté la formation de produits d'altérations au cours de nos manipulations. Le produit dosé dans les viscères est donc bien l'hydromorphone du point de départ.

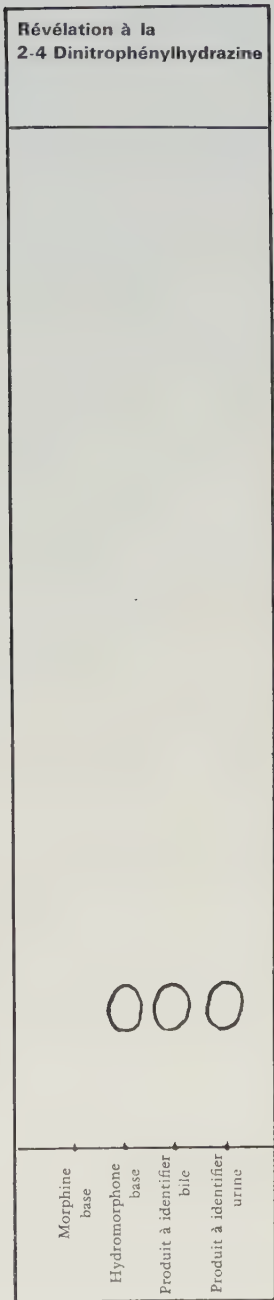
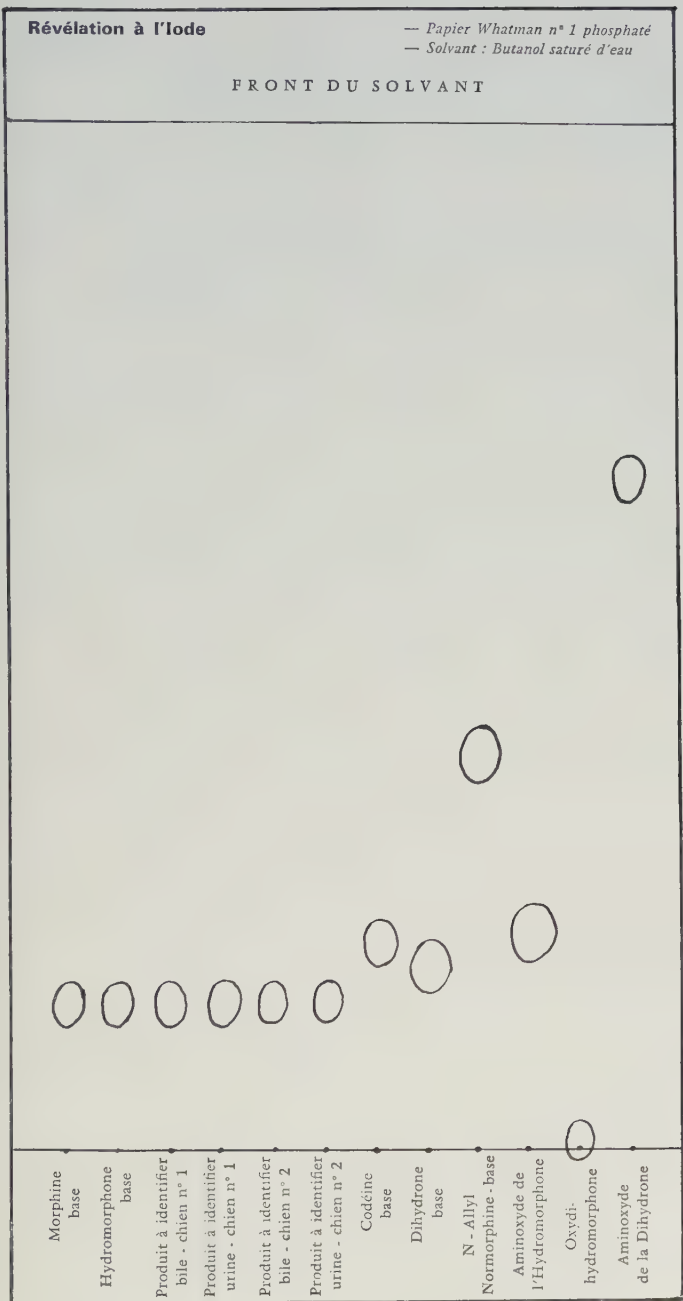
Pour plus de sécurité, nous avons vérifié la présence de l'hydromorphone dans les solutions organiques résiduelles de la méthode de M. et P. CHAMBON. Pour cela, nous avons récupéré les solutions de l'ester paranitrobenzoïque dans le dichloréthane (fin de la phase 5) après dissociation du complexe avec le méthylorange. Le solvant évaporé laisse un résidu que nous traitons par l'acide chlorhydrique au 1/10 et que nous passons à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes ; cette opération permet l'hydrolyse de l'ester paranitrobenzoïque.

On participe alors à une nouvelle extraction de la base, selon la méthode précédemment décrite et celle-ci est chromatographiée sur papier phosphaté. Là encore, le Rf et les réactions colorées nous permettent d'affirmer que le toxique ainsi dosé est bien l'hydromorphone :

$R_f = 0,14$.

Réaction à la 2-4 dinitrophénylhydrazine positive.

Nous avons aussi essayé de caractériser l'hydromorphone par le Rf de son complexe ester paranitrobenzoïque-méthylorange. Le complexe déposé sur papier Whatman phosphaté et développé par le butanol saturé d'eau ne donne pas de résultats satisfaisants, car nous avons une décomposition progressive du complexe lors de la migration, avec libération de méthylorange. Nous n'obtenons donc aucun Rf valable.



Chromatogramme.

5° IDENTIFICATION DU DERIVE DE CONJUGAISON DE L'HYDROMORPHONE DANS LES URINES

Nous allons, dans une première partie, isoler et purifier la forme conjuguée de l'hydromorphone, puis sur le produit obtenu, nous caractériserons d'une part la molécule responsable de cette conjugaison et d'autre part l'alcaloïde après hydrolyse.

1. Isolement de la forme conjuguée.

L'urine (100 ml) du chien n° 2, est amenée à pH 7,4 avec du bicarbonate de sodium, puis triturée au mortier avec 3 grammes d'Uréase Mérieux. On porte alors à 37° et maintient cette température pendant une heure et demie. On a ainsi destruction de l'urée qui, par sa forte concentration, gênerait la suite des opérations.

On laisse ensuite refroidir la solution, centrifuge et filtre. Le filtrat est concentré dans le vide à 20 ml environ à faible température (50 à 60° environ), puis desséché dans un dessiccateur à acide sulfurique. Nous préparons alors une colonne à chromatographie [121, 140] avec une allonge de 17 mm de diamètre intérieur et de 760 mm de haut, et de la poudre de cellulose pour chromatographier (Référence : Zellulosepulver n° 123 für die Säulenchromatographie : Carl SCHLEICHER et SCHÜLL, Dassel/Kr. Einbeck). Pour cela, un tampon de laine de verre est placé à la partie inférieure de la colonne et on remplit avec une bouillie de poudre de cellulose dans le mélange n-butanol - acide acétique - eau : (40 - 10 - 20). Il faut arriver à une colonne de cellulose d'environ 37 à 40 cm de haut.

L'extrait urinaire desséché est alors trituré avec 30 ml du mélange précédent, puis centrifugé. Le liquide surnageant est alors passé sur la colonne et on développe sous une pression de 7 à 8 cm de mercure avec le même

mélange. Les 105 premiers millilitres sont rejetés et on recueille les 150 ml suivants. La solution obtenue est évaporée à sec par distillation sous pression réduite à environ 50°.

On épuise successivement ce résidu avec deux fois 2 ml d'eau distillée froide et les liquides obtenus sont centrifugés. Nous ajoutons à la solution 20 ml de méthanol froid : il se forme alors un abondant précipité cristallin qu'on élimine par centrifugation. Le liquide surnageant est évaporé à sec. On renouvelle le même traitement.

Le résidu est traité avec 20 ml de méthanol à ébullition pendant 5 minutes. Le méthanol est séparé et on renouvelle le traitement. Les deux solutions méthanoliques sont réunies et évaporées sous pression réduite. De nouveau ce résidu est dissous dans 4 ml d'eau, auxquels nous ajoutons 10 ml de méthanol froid. On centrifuge et concentre la solution surnageante après sa séparation.

Cette solution est ensuite chromatographiée sur papier Whatman n° 1 avec le solvant :

n-butanol : 10,

Acide acétique : 3,

Eau : 4,5.

La solution est déposée en une longue barre qu'on développe par voie ascendante avec le solvant indiqué. Après le développement, une fine bande du chromatogramme est prélevée et révélée à l'iode (voir schéma page 62).

Nous mettons ainsi en évidence deux spots de R_f 0,61 et 0,24. Le spot de R_f 0,61 peut être identifié à l'hydromorphe. On découpe sur le chromatogramme la bande de R_f 0,24 et l'élue avec de l'eau distillée. La solution d'élution est reconcentrée, redéposée suivant la même technique et rechromatographiée. On élue de nouveau.

PAPIER WHATMAN N° 1

SOLVANT : n-BUTANOL - Ac-ACÉTIQUE - EAU (10-3-4,5)

FRONT DU SOLVANT

BANDE RÉVÉLÉE À L'IODE

Rf = 0,61

Rf = 0,24

ZONE À ÉLUER

Chromatogramme.

Ces deux purifications nous permettent ainsi d'isoler la forme conjuguée seule.

2. IDENTIFICATION DE LA FORME CONJUGUÉE.

a) *Caractérisation du groupement basique :*

Une partie de l'éluat est additionnée du 1/10 de son volume d'acide chlorhydrique concentré et passée à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes, pour hydrolyser le conjugué.

La solution est ensuite concentrée et extraite par le chloroforme alcoolique en milieu alcalin selon la méthode précédemment indiquée. Le chloroforme est ensuite évaporé sous pression réduite à 30°. Le résidu repris par quelques gouttes de chloroforme purifié et lavé est déposé sur papier Whatman n° 1 phosphaté et on peut ainsi, après développement par voie ascendante, identifier l'hydromorphe par son Rf et ses réactions colorées, comparativement à l'hydromorphe témoin (Rf = 0,14 et réaction à la 2-4 dinitrophénylhydrazine positive).

b) *Caractérisation de la partie conjuguée :*

Une seconde partie de l'éluat va nous permettre d'identifier la nature de la molécule conjuguant. Nous employons pour cela deux méthodes permettant de révéler et de doser l'acide glycuronique libre et l'acide glycuronique des glycuronides : méthode de DISCHE et méthode de FISHMAN.

— Méthode de DISCHE [29].

Principe : une solution contenant de l'acide glycuronique ou des glycuronides est chauffée avec de l'acide sulfurique concentré au B-M bouillant. Le mélange est ensuite additionné d'une solution alcoolique de carbazole. En présence d'acide glycuronique libre ou lié, il

se développe une belle coloration rose qui s'intensifie pendant 2 heures et reste stable au moins une heure. Cette réaction sert de base à DISCHE pour le dosage colorimétrique de l'acide glycuronique total (acide glycuronique libre et acide glycuronique entrant dans les conjugaisons).

Le maximum d'absorption se situe à 530 m μ .

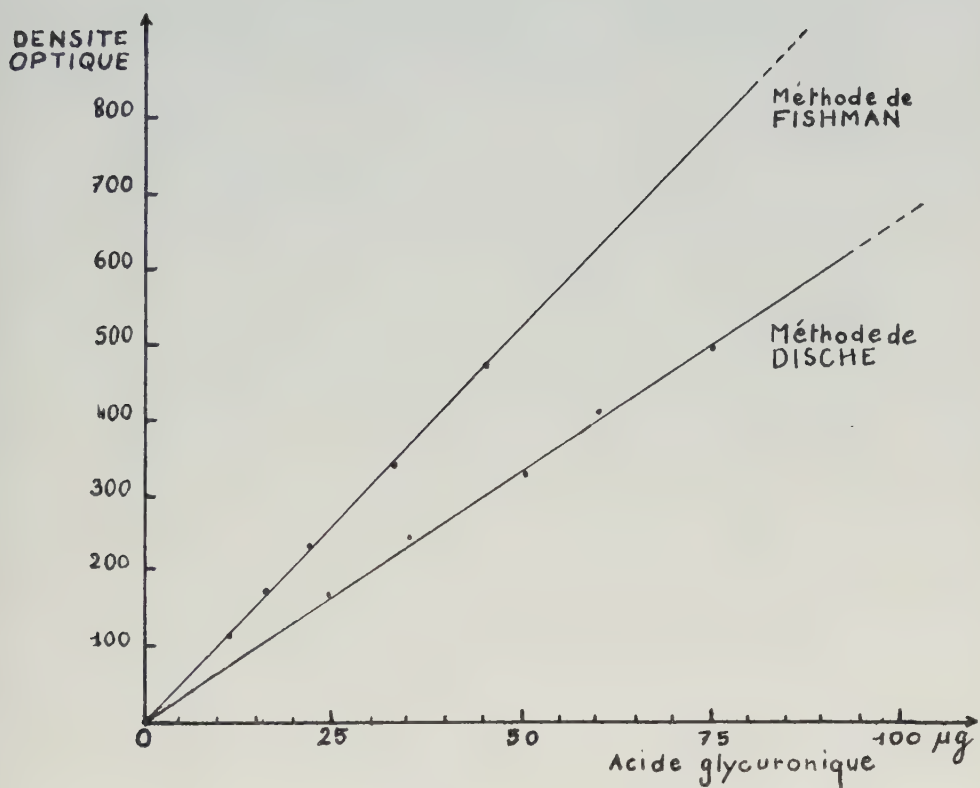
— Méthode de FISHMAN [40].

Cette méthode utilise la réaction au naphtorésorcinol (42,130).

Principe : sur un mélange d'acide glycuronique et de glycuronide, on fait agir l'iode à pH 10,1 qui oxyde les sucres et l'acide glycuronique libre. Après l'oxydation, on détruit l'iode en excès et passe en milieu fortement acide par addition d'acide sulfurique 6 N qui libère l'acide glycuronique des glycuronides. Cet acide glycuronique en milieu sulfurique donne par addition de naphtorésorcinol une belle coloration violette extractible par le toluène.

La coloration a un maximum d'absorption à 565 m μ . Pour vérifier la sensibilité de ces deux méthodes, nous avons utilisé l'acide glycuronique d'abord ; nous avons obtenu les courbes ci-contre :

Nous avons voulu ensuite essayer ces deux techniques sur un glycuronide. Nous avons obtenu biologiquement chez le chien le glycuronide du bornéol. Pour cela, nous avons fait ingérer avec de la viande hachée, 7 g de bornéol par jour pendant 4 jours à deux chiens, installés dans des cages dont le fond nous permettait de recueillir les urines. Les urines furent collectées au fur et à mesure de leur production et stockées au réfrigérateur. Les urines furent ensuite traitées selon la méthode de QUICK [22, 107] : nous faisons d'abord une défécation au réactif de COURTONE. Puis le liquide est filtré et addi-



Courbe d'étalonnage.

**Valeurs de la densité optique
en fonction de la concentration en acide glycuronique**

<i>Méthode de DISCHE</i>	Acide glycuronique	Densité optique *
	25 microgrammes	167
	35	240
	50	330
	60	410
	75	498
	100	665

<i>Méthode de FISHMAN</i>	Acide glycuronique	Densité optique *
	11,11 microgrammes	117
	16	177
	22,22	230
	33,33	340
	44,44	472

* Densité optique mesurée au *Spectrophotomètre électronique Jobin-Yvon*.

tionné à ébullition d'acétate de zinc qui donne un précipité de bornéol-glycuronate de zinc. Le précipité filtré et lavé à l'eau, est ensuite séché puis dissous dans l'acide sulfurique à chaud. Par refroidissement on obtient une cristallisation de bornéol-glycuronide qu'on recristallise dans l'eau chaude. Nous avons pu ainsi obtenir 11,5 g d'acide bornéol-glycuronique. Nous avons essayé les deux méthodes sur ce glycuronide ; toutes deux se sont montrées très sensibles. Nous avons pu détecter 10 μ g d'acide glycuronique pour 5 ml de solution (acide glycuronique du bornéol glycuronide).

Les deux méthodes ont été utilisées à la détection d'acide glycuronique sur des parties aliquotes de l'éluat contenant l'hydromorphone conjuguée. Dans les deux cas, nous avons obtenu des réactions nettement positives. Nous pouvons donc ainsi affirmer que la forme conjuguée de l'hydromorphone est représentée dans les urines par le glycuronide de l'hydromorphone.

Nous avons, de plus, essayé la réaction au ferricyanure ferrique sur ce glycuronide isolé à l'état pur. La réaction positive pour l'hydromorphone libre, s'est montrée négative pour le conjugué.

Il faut donc penser que la fonction phénol responsable de cette réaction est bloquée et est le point de fixation de l'acide glycuronique.

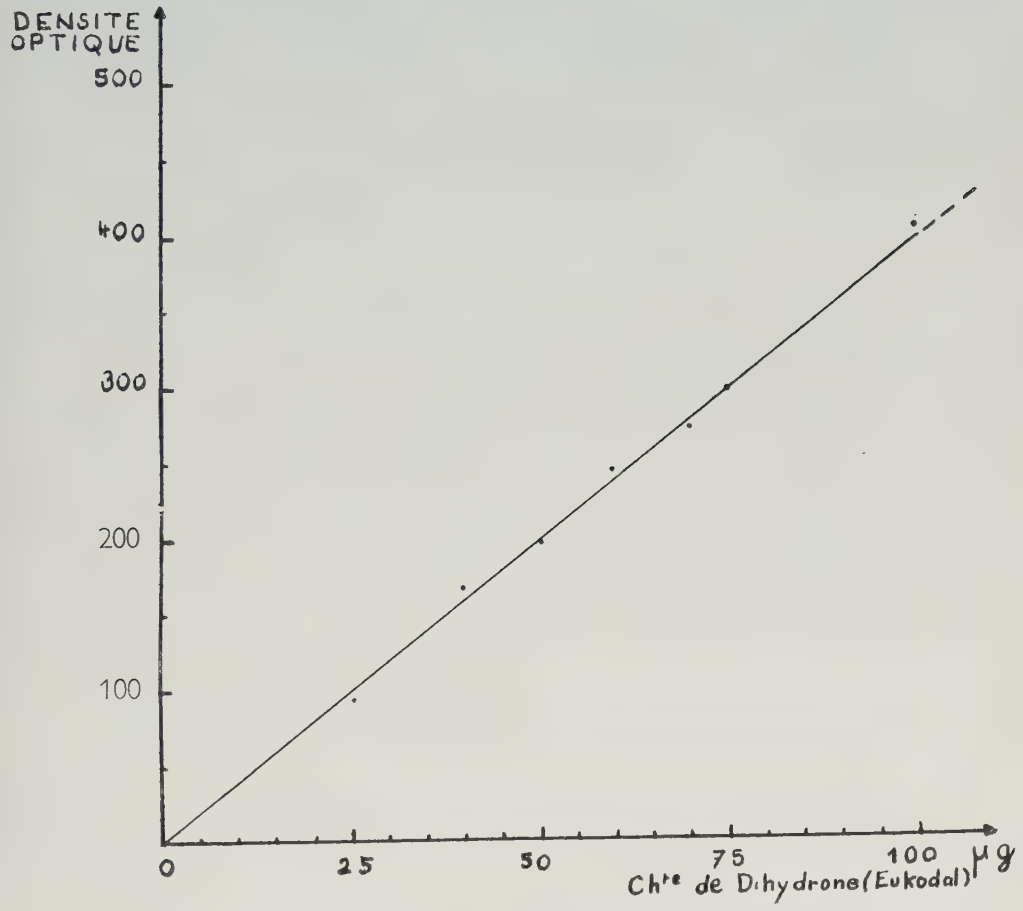
II. — METABOLISME ET ELIMINATION DE LA DIHYDRONE (EUKODAL) CHEZ LE CHIEN

Le plan d'étude du métabolisme et de l'élimination de la dihydrone est calqué sur le chapitre précédent consacré à l'hydromorphone. Comme pour cette dernière, nous avons d'abord exposé la technique de dosage : nous avons utilisé la technique de M. et P. CHAMBON, mais comme nous le verrons, avec une modification. Puis, dans une deuxième partie, nous avons en effectuant le dosage du toxique tant sous forme libre que sous forme liée, étudié sa répartition dans l'organisme.

Enfin, dans les troisième et quatrième parties, nous nous sommes préoccupés d'identifier le toxique et de déterminer la constitution de sa forme liée.

1° METHODE DE DOSAGE

Nous avons utilisé la méthode de M. et P. CHAMBON, mais la structure de la dihydrone nous a imposé une modification. La dihydrone qui, comme nous l'avons vu, est la dihydrohydroxycodéinone, a perdu la fonction phénol libre existant dans la morphine et, par là, les caractères de solubilité dans les alcalis. D'où la nécessité de supprimer la séparation des bases non-morphinoïdes du paragraphe 2 de la méthode. La déprotéinisation est suivie directement de l'hydrolyse chlorhydrique à l'autoclave. La suite des opérations est identique à la précédente.



Courbe d'étalonnage du chlorhydrate de dihydron.

Nous avons fait l'étalonnage avec le chlorhydrate de dihydrone cristallisé. Nous avons ainsi obtenu pour des valeurs de 25 à 100 μ g, un tracé parfaitement rectiligne (voir courbe page 69).

**Valeurs de la densité optique
en fonction de la concentration en Eukodal**

Eukodal	Densité optique *
25 microgrammes	95
40	166
50	199
60	244
70	275
75	300
100	410

* Densité optique mesurée au *Spectrophotomètre électronique Jobin-Yvon*.

2° DOSAGE DE LA DIHYDRONE CHEZ LE CHIEN N° 3

Nous avons pris une chienne de 17 kg et lui avons injecté par voie sous-cutanée 36 mg de chlorhydrate de dihydrone (Eukodal), soit 2,11 mg/kg. L'injection a eu lieu à 18 heures. Comme pour les cas précédents, l'animal a été placé dans une cage avec de l'eau à volonté. Nous l'avons sacrifié le lendemain matin à 10 heures (soit 16 heures après l'administration), par saignée de la carotide après anesthésie à l'éther. Nous avons alors

effectué le prélèvement des viscères de l'animal avec les précautions signalées lors des deux premières expériences, pour éviter toute perte de toxique, en particulier pour la vésicule biliaire et la vessie.

Les prélèvements sont les suivants :

- Vésicule biliaire contenant 13 g de bile.
- Vessie contenant 340 g d'urine.
- Foie : 510 g.
- Reins : 80 g.
- Sang : 1350 g.
- Estomac : l'estomac étant vide, nous avons abondamment rincé sa paroi avec de l'eau faiblement chlorhydrique afin de récupérer les produits de sécrétion.
Eau de lavage : 150 g.
- Intestin : le contenu et les eaux ayant servi au lavage de la muqueuse intestinale ont un poids de 387 g.

L'animal n'a pas uriné entre le moment de l'injection et la mort.

Pour éviter l'hydrolyse de la forme liée dans les prélèvements importants tels que la bile et les urines, nous avons commencé l'analyse le jour même (5 heures environ après la mort). Les autres viscères ont été conservés en flacons bouchés au réfrigérateur à + 4°, en attendant leur analyse qui s'est échelonnée sur un mois et demi.

Nous avons obtenu les résultats résumés dans le tableau page 72.

Les chiffres obtenus se rapportent toujours à la totalité de l'organe ou du liquide biologique analysé.

CONCLUSION : Dans ce tableau, nous voyons qu'il est possible comme pour l'hydromorphe, de retrouver,

Résultats pour le chien n° 3

Dose injectée : 2,11 mg/kg d'Eukodal (soit 36 mg).

Mort 16 heures après l'injection.

ORGANES ou LIQUIDES BIOLOGIQUES			Méthode de M. et P. CHAMBON		
Poids total			DL *	DC *	DT *
			**		
Analyse immédiate	Bile	13 g	traces	660	660
	Urines	340 g	1 088	698	1 786
Analyse échelonnée sur 1 mois et demi	Estomac	150 g	0		traces
	Intestins	387 g	250	1 452	1 702
	Foie	510 g	719	809	1 528
	Reins	80 g	traces	1 466	1 466
	Sang.....	1 350 g	0		traces

Bilan : 7,142 mg soit 19,8% de la dose injectée.

* DL = Dihydrone libre.

* DC = — conjuguée.

* DT = — totale.

** Les résultats sont exprimés en microgrammes.

16 heures après l'injection, le toxique réparti dans l'ensemble de l'organisme et sous deux formes : forme libre et forme liée.

Mais nous trouvons ici une répartition de l'alcaloïde très nettement différente de celle du Dilaudid. Le foie et les reins sont riches en toxique. D'autre part, la présence dans l'intestin de celui-ci en proportion élevée par rapport aux doses retrouvées dans les urines, laisse prévoir une élimination importante par les matières fécales.

3° IDENTIFICATION DE LA DIHYDRONE DANS LES URINES ET LA BILE

Le toxique a été identifié d'une part par son Rf chromatographique, d'autre part par les différentes réactions colorées utilisées pour l'hydromorphe.

Nous avons préparé les quelques témoins nécessaires à l'identification : dihydrone base, dihydrone aminoxyde et codéine base (voir chapitre précédent).

Pour isoler le toxique à caractériser, nous sommes parti des solutions chlorhydriques 0,5 N restant de la méthode de dosage. Après extraction de la base par le chloroforme en milieu alcalin, nous l'avons déposé sur papier phosphaté. Les chromatogrammes développés par voie ascendante avec le butanol saturé d'eau et révélés par les réactifs classiques tels que le réactif de Dragendorf, l'iode..., et par la 2-4 dinitrophénylhydrazine, nous donnent les résultats suivants :

Dihydrone base : Rf 0,17.

Codéine base : 0,20.

Nalorphine base : 0,38.

Dihydrone aminoxyde : 0,65.

Produit à identifier extrait des urines et de la bile, Rf 0,17. La réaction à la 2-4 dinitrophénylhydrazine est positive avec ce produit (voir page ci-contre).

Le toxique que nous avons retrouvé et dosé est donc bien la dihydrone. Les résultats obtenus avec l'alcaloïde extrait des solutions organiques résiduelles du dosage contenant l'ester paranitrobenzoïque et traitées à l'auto-clave sont identiques.

4° IDENTIFICATION DE LA FORME CONJUGUEE DE LA DIHYDRONE DANS LES URINES

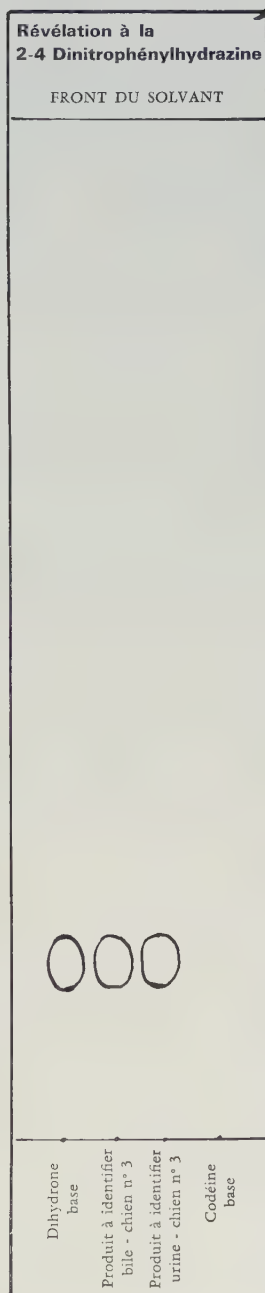
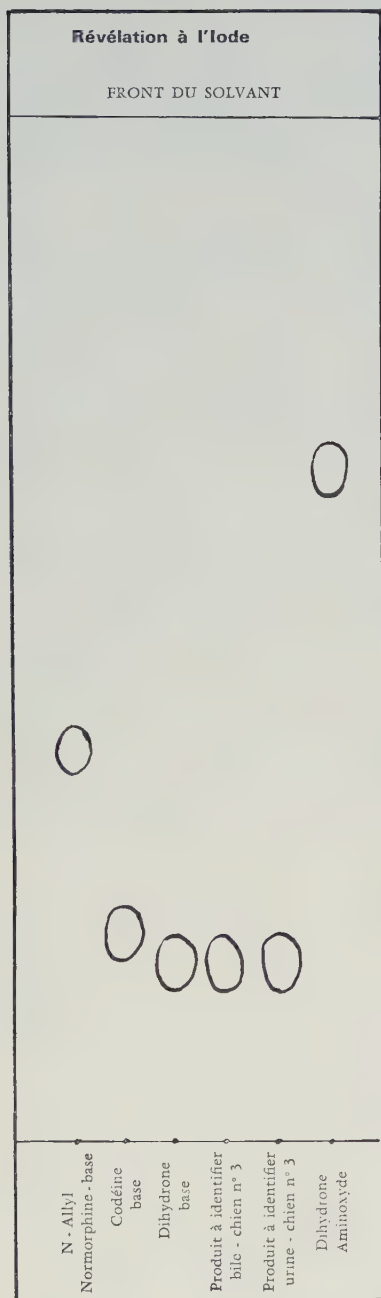
Nous allons d'abord isoler cette forme conjuguée puis caractériser les différents éléments entrant dans sa constitution.

1. ISOLEMENT DE LA FORME CONJUGUÉE.

Sur 100 ml d'urine, nous effectuons successivement les opérations décrites lors de l'isolement du glycuronide de l'hydromorphone :

- élimination de l'urée par action de l'uréase à 37° et à pH 7,4 pendant une heure et demie ;
- centrifugation et filtration des urines ainsi traitées ;
- dessiccation du filtrat dans le vide puis reprise du résidu par le solvant n-butanol-acide acétique-eau (40-10-20) ;
- enfin chromatographie sur colonne de cellulose du liquide obtenu.

On développe avec le solvant indiqué ci-dessus. Les 105 premiers ml sont rejetés et on récupère alors les 150 ml suivants, qui seront évaporés à sec. Le résidu repris par deux fois 2 ml d'eau subit des purifications répétées par précipitation méthanolique comme dans le cas de l'hydromorphone.



PAPIER WHATMAN N° 1 PHOSPHATÉ — SOLVANT : BUTANOL SATURÉ D'EAU

Chromatogramme.

Le produit obtenu est déposé sur papier Whatman n° 1 en une longue barre qu'on développe par voie ascendante avec le solvant : n-butanol-acide acétique-eau (10-3-4,5).

La révélation à l'iode d'une fine bande du chromatogramme montre deux taches : une première tache de Rf 0,50 correspondant à la dihydrone et une deuxième tache de Rf 0,22. On découpe alors sur le chromatogramme la bande de Rf 0,22 et l'éluée à l'eau distillée.

Ce même traitement (chromatographie sur papier et élution) est renouvelé une fois. La forme conjuguée du toxique est alors obtenue très pure.

2. IDENTIFICATION DE LA FORME CONJUGUÉE :

a) *Caractérisation du groupement basique :*

Une partie de l'éluat obtenu est passée à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes, en milieu fortement chlorhydrique. Nous obtenons ainsi la libération du toxique. Le toxique extrait en milieu alcalin par le chloroforme est alors identifié par chromatographie sur papier phosphaté. L'alkaloïde de Rf 0,17 et donnant là encore une réaction à la 2-4 dinitrophénylhydrazine positive est bien la dihydrone.

b) *Caractérisation de la molécule responsable de la conjugaison :*

Sur la deuxième partie de l'éluat, nous avons effectué la réaction de DISCHE au carbazole et la réaction de FISHMAN au naphtorésorcinol.

Les réactions, toutes deux positives, nous prouvent la présence dans la forme conjuguée de la dihydrone d'acide glycuronique.

La forme liée ainsi isolée est donc le glycuronide de la dihydrone.

DISCUSSION

Au terme de ces travaux personnels, nous avons voulu confronter les résultats que nous avons obtenus et ceux fournis par la littérature concernant le métabolisme et l'élimination de ces produits. En fait, comme nous l'avons vu, les travaux effectués antérieurement sur l'hydromorphe et la dihydrone peuvent se résumer à peu de choses, tout au moins en ce qui concerne cette question du métabolisme.

FREISCHMANN rechercha et isola l'hydromorphe dans les urines d'un chien recevant des injections journalières de 30 à 100 mg, pendant 24 jours. Mais lors de ces expériences, aucunes données quantitatives, ni sur les taux retrouvés, ni sur l'existence de formes liées, ne furent précisées par l'auteur.

Pour la dihydrone étudiée aussi chez le chien et administrée par voie sous-cutanée, SCHÜBEL donne des précisions assez brèves sur l'élimination urinaire du toxique (12 % des doses injectées sont retrouvés dans les urines d'un chien traité pendant près de 15 jours avec des doses journalières croissantes de dihydrone, dépassant 100 mg). Là encore, la possibilité pour le toxique de s'éliminer sous une autre forme que celle d'origine, ne fut pas envisagée.

Les travaux de ces dernières années, malgré l'utilisation de méthodes modernes, ne se sont guère attachés à des déterminations quantitatives. Presque toutes les

publications relatives à l'excrétion de la dihydroné et de l'hydromorphone reposent uniquement sur la description de techniques de détection et d'identification.

Notre but a été précisément de rechercher les proportions de toxique retrouvées tant sous forme libre que sous forme conjuguée par rapport aux doses injectées. Nous avons vu que la méthode classique de STASS-OTTO présentait une lacune importante dans la recherche de ces produits, comme pour la morphine d'ailleurs, ainsi que l'ont montré M. et P. CHAMBON dans leur article « Considérations sur de nouvelles méthodes de recherche de la morphine au cours d'une expertise toxicologique ». Nous voyons donc qu'il est nécessaire au cours d'une expertise, lorsque des indices orientent suffisamment la recherche vers des dérivés de type morphinoïde, d'utiliser parallèlement à la méthode classique de STASS-OTTO, la méthode de M. et P. CHAMBON, inspirée de celle de Woods qui permet ainsi de retrouver non seulement le toxique sous sa forme libre, mais aussi le toxique dissimulé sous forme de conjugué glycuronique.

Nous avons confronté nos résultats avec ceux trouvés pour la morphine.

— Pour la bile et les urines.

Morphine : résultats de M. et P. CHAMBON [21] :

Animal sacrifié 8 heures après une injection sous-cutanée de 7,5 mg/kg de chlorhydrate de morphine.

— pour la bile :

- Morphine libre : 1,08 mg.
- Morphine totale : 21 mg, soit 16 % de la dose injectée.

— pour les urines :

- Morphine libre : 28 mg.
- Morphine totale : 49 mg, soit 32 % de la dose injectée.

Hydromorphone.

Animal sacrifié 9 heures après une injection sous-cutanée de 40 mg de Dilaudid, soit 2,05 mg/kg.

— pour la bile :

- Hydromorphone libre : 0,058 mg.
- Hydromorphone totale : 3,966 mg, soit 9,91 % de la dose injectée.

— pour les urines :

- Hydromorphone libre : 1,493 mg.
- Hydromorphone totale : 2,781 mg, soit 6,95 % de la dose injectée.

Animal sacrifié 16 heures après une injection sous-cutanée de 60 mg de Dilaudid, soit 3,07 mg/kg.

— pour la bile :

- Hydromorphone libre : 0.
- Hydromorphone totale : 0,348 mg, soit 0,58 % de la dose injectée.

— pour les urines :

- Hydromorphone libre : 1,060 mg.
- Hydromorphone totale : 13,415 mg, soit 22,35 % de la dose injectée.

Dihydrone.

Animal sacrifié 16 heures après une injection sous-cutanée de 36 mg d'Eukodal, soit 2,11 mg/kg.

— pour la bile :

- Dihydrone libre : 0.
- Dihydrone totale : 0,660 mg, soit 1,83 % de la dose injectée.

— pour les urines.

- Dihydrone libre : 1,088 mg.
- Dihydrone totale : 1,786 mg, soit 4,96 % de la dose injectée.

Les résultats, quoique assez différents, nous montrent la nécessité de prélever pour une expertise toxicologique la vésicule biliaire et la vessie avec leur contenu, et ceci avec les plus grandes précautions (ligatures, lors de l'autopsie, des canaux aboutissant aux organes avant toute chose). Nous voyons en effet pour ces trois toxiques que c'est dans ces deux prélèvements essentiels que nous retrouvons des quantités importantes du toxique. Nous avons dans nos expériences, utilisé des doses relativement faibles, quoique encore nettement supérieures à celles utilisées en clinique. Il faut penser que lors de l'administration de doses thérapeutiques, ces toxiques peuvent encore être retrouvés malgré ces faibles doses, dans ces deux prélèvements d'importance capitale où ils se concentrent (bile et urine vésicale).

— Pour le contenu intestinal.

Morphine : résultats de Woods [140] :

Animal tolérant sacrifié 4 heures après l'injection sous-cutanée de 30 mg/kg de base morphine.

— Jéjunum :

- 6 μ g/gramme en morphine libre.
- 24 μ g/gramme en morphine liée.

— Côlon :

- 9 μ g/gramme en morphine libre.
- < 2 μ g/gramme en morphine liée.

Animal sacrifié 12 heures après l'injection sous-cutanée de 30 mg/kg de base morphine : résultats en pourcentage de la dose injectée.

— Duodénum :

- Morphine libre : 0,004 %.
- Morphine liée : 0,12 %.

— Jéjunum :

- Morphine libre : 0,014 %.
- Morphine liée : 0,57 %.

— Côlon :

- Morphine libre : 0,35 %.
- Morphine liée : 2 %.

Le rapport morphine libre/morphine liée pour le duodénum, le jéjunum et le côlon étant respectivement de 0,03, 0,02 et 0,17.

Hydromorphone.

Animal sacrifié 9 heures après une injection sous-cutanée de 2,05 mg/kg de chlorhydrate d'hydromorphone.

— Intestins :

- Hydromorphone libre : 112 μg , soit 0,28 % de la dose injectée.
- Hydromorphone liée : 262 μg , soit 0,65 % de la dose injectée.

Animal sacrifié 16 heures après une injection sous-cutanée de 3,07 mg/kg de chlorhydrate d'hydromorphone.

— Intestins :

- Hydromorphone libre : 232 μg , soit 0,38 % de la dose injectée.
- Hydromorphone liée : 587 μg , soit 0,97 % de la dose injectée.

Dihydrone.

Animal sacrifié 16 heures après une injection sous-cutanée de 2,11 mg/kg de chlorhydrate de dihydrone.

— Intestins :

- Dihydrone libre : 250 μg , soit 0,69 % de la dose injectée.
- Dihydrone liée : 1452 μg , soit 4 % de la dose injectée.

Nous voyons là aussi l'importance lors de l'autopsie, de prélever le tube digestif et son contenu qui révèlent la présence d'une quantité de toxique non négligeable. Enfin, il est bon de vérifier sa présence dans d'autres organes, tels que le rein et le foie. Pour la dihydrone par exemple, nous retrouvons dans la totalité des reins 1466 μg , soit 4 % de la dose injectée.

Donc la bonne marche d'une expertise dépend d'abord essentiellement des précautions prises lors de l'autopsie et surtout du choix des organes à analyser. Pendant l'expertise, rappelons encore la nécessité absolue d'employer des solvants organiques très purs, surtout exempts de peroxydes, auxquels les substances basiques sont très sensibles.

Enfin, signalons l'importance de la forme conjuguée du toxique qui, sans méthode spéciale, risque d'être perdue.

Un point intéressant à aborder ici, est l'étude de ce conjugué glycuronique. FUJIMOTO [48], qui avait isolé le glycuronide de la morphine et l'avait obtenu cristallisé, en avait donné la constitution. Dans ce glycuronide isolé chez l'homme, l'acide glycuronique est fixé en 3 sur la fonction phénol.

Pour l'hydromorphone, la seule possibilité de conjugaison se situe sur la fonction phénol, puisque la fonction alcool qui existait dans la morphine est dans ce cas transformée en cétone ; nous avons d'ailleurs vérifié sur le glycuronide de l'hydromorphone que cette fonction phénol est bien bloquée, en utilisant la réaction au

ferricyanure ferrique, réaction très positive et sensible avec l'hydromorphone libre. Pour ce conjugué, nous n'obtenons aucune réaction. Quant à la dihydroné, seule la fonction alcool en 8 doit être en cause dans la glycuconjugaison.

Nous voyons ainsi que la glycuconjugaison a une importance capitale dans la recherche d'un toxique en dissimulant celui-ci vis-à-vis de ses réactions chimiques classiques. Mais il faut aussi signaler son intérêt dans la valeur d'une expertise toxicologique. Imaginons en effet qu'un expert chargé de l'analyse des viscères d'un cadavre, retrouve des traces de toxique ; la défense peut alors s'appuyer sur le fait qu'une main frauduleuse a peut-être ajouté le toxique dans les prélèvements. Si le toxicologue donne des résultats mentionnant les proportions de toxique retrouvé d'une part sous forme libre, d'autre part sous forme conjuguée, la thèse de la défense ne tient plus, car alors la présence du dérivé conjugué apporte la preuve du passage dans l'organisme du toxique. D'où l'importance de différencier les formes libres et liées du toxique.

Après ces remarques, il faut signaler un fait important que nous retrouvons d'ailleurs pour l'hydromorphone dans nos deux premières expériences, à savoir l'hydrolyse naturelle dans les viscères des glycuronides par les glycuronidases existant dans l'organisme.

Ainsi dans le premier cas où les analyses sont commencées 48 heures après la mort de l'animal, il nous a été possible de déceler dans les urines 1493 μg d'hydromorphone libre pour 1288 μg de conjuguée (cette dernière représentant 46 % de la quantité totale retrouvée dans ce prélèvement).

Dans le deuxième cas où l'analyse est commencée 4 heures après la mort de l'animal, nous retrouvons

1060 μg d'hydromorphone libre pour 12355 μg de conjuguée (cette dernière représentant 92 % de la quantité totale retrouvée dans les urines).

Nous voyons donc ainsi que malgré le maintien des viscères au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}$, il y a eu hydrolyse ; les glycuronides agissant encore à cette température. Il faut alors remarquer que lorsqu'un expert aura à analyser les viscères d'un sujet dont la mort remonte à quelques jours seulement et dont le corps a été conservé au froid, il pourra retrouver le conjugué glycuronique. Mais quand il sera en présence d'un cadavre qui a été exhumé après un long séjour en terre, il aura des difficultés pour récupérer le toxique sous sa forme conjuguée, les glycuronidases ayant fait leur action. Dans ce cas, si le toxicologue retrouve le dérivé suspecté, il n'aura aucune preuve de son passage préalable dans l'organisme, si ce n'est sa dispersion parfaite à l'intérieur des tissus.

Un fait intéressant, un peu à part dans cette discussion, et que nous avons retrouvé dans nos trois expériences, mérite d'être cité aussi : les animaux, entre le temps de l'injection et la mort n'ont pas uriné. Cette remarque confirme les travaux déjà anciens de BONSMANN (13, 13 bis) qui montrèrent que la morphine et ces dérivés aux doses employées dans nos expériences, inhibent la diurèse des chiens ainsi traités. Aux doses thérapeutiques, cette propriété est négligeable heureusement.

CONCLUSIONS

L'étude que nous avons entreprise, sur le métabolisme et l'élimination de deux alcaloïdes apparentés à la morphine, l'hydromorphone (Dilaudid) et la dihydroné (Eukodal) a été conduite chez le chien après administration par voie sous-cutanée de doses relativement peu importantes (environ 2 à 3 mg/kg), les animaux ayant été sacrifiés 9 à 16 heures après l'injection.

Nos recherches orientées par les travaux de notre Maître, le Professeur M. CHAMBON, vers la mise en évidence de forme libre et de forme liée, c'est-à-dire conjuguée, dans les viscères ou liquides biologiques, selon les travaux antérieurs de Woods notamment, utilisant des concentrations très élevées de l'ordre de 30 mg/kg, nous ont amené aux conclusions suivantes.

1. — Dans le cas de l'hydromorphone, cette dernière peut être décelée soit directement, soit après hydrolyse chlorhydrique à l'autoclave, et dosée selon la méthode colorimétrique inspirée de celle de Woods. L'alcaloïde a été caractérisé par ses réactions colorées classiques et par chromatographie sur papier phosphaté inspirée de la méthode de MUNIER.

Le rapport forme conjuguée/forme libre dans le cas de prélèvements effectués 9 heures après l'injection sous-cutanée est de 0,86 pour les urines, 2,33 pour l'intestin, 67,37 pour la bile, 0,68 pour le foie et environ 15 pour les reins. Lorsque les prélèvements ont été

effectués 16 heures après l'injection, ce même rapport forme liée/forme libre est de 11,65 pour l'urine, 2,53 pour l'intestin, 348 pour la bile, 0,46 pour le foie et 0,55 pour les reins.

2. — Pour la dihydrone, le même protocole analytique a été suivi. Les prélèvements ayant été effectués 16 heures après l'injection sous-cutanée, le rapport forme liée/forme libre est de 0,64 pour l'urine, 5,80 pour l'intestin, 660 pour la bile, 1,12 pour le foie et 1466 environ pour le rein.

3. — L'introduction de ces nouvelles méthodes d'expertise toxicologique nous a permis de confronter leurs résultats avec ceux obtenus selon la classique méthode de STASS-OTTO, OGIER et KOHN-ABREST. Cette dernière ignore les formes conjuguées stables. Cependant nous avons pu, en procédant à l'hydrolyse chlorhydrique des liqueurs résiduaires stériles de la méthode de STASS-OTTO, retrouver une notable partie des alcaloïdes qui s'y trouvaient sous forme conjuguée, soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques précédemment utilisés dans le protocole analytique classique.

4. — La comparaison des dosages obtenus dans le cas de l'hydromorphone (Dilaudid) sur les prélèvements effectués 9 à 16 heures après l'injection sous-cutanée de l'alcaloïde, nous montre les résultats suivants :

La bile recueillie après 9 heures contient des quantités considérables d'alcaloïde conjugué (près de 10 % de la quantité injectée) de 67 fois supérieures à la fraction libre ; 16 heures après l'injection, on n'y retrouve que la forme conjuguée mais en quantité beaucoup plus faible, à peu près 0,6 % de la dose injectée.

L'urine contient, après 9 heures, des proportions à peu près équivalentes de forme libre et de forme liée, représentant pour l'ensemble environ 7 % de la dose

injectée. Tandis que 16 heures après, la forme liée est plus de 11 fois supérieure à la forme libre, la quantité totale retrouvée représentant 22,3 % de la dose injectée.

L'intestin contient aussi les deux formes dans un rapport conjuguée/libre à peine supérieur à 2 avec toutefois une quantité double dans le prélèvement après 16 heures, les autres organes n'en révélant que des quantités assez faibles.

Ainsi paraît s'accuser le rôle très important du foie dans la conjugaison, et l'élimination massive et rapide par l'urine des formes conjuguées à côté de faibles proportions de forme libre.

5. — La dihydrone (Eukodal) recherchée et dosée dans les viscères et liquides biologiques 16 heures après l'injection, nous montre des résultats assez différents de ceux obtenus dans le cas de l'hydromorphone après 16 heures.

Si la bile ne contient encore que la seule forme conjuguée et en proportion peu considérable, l'urine se présente avec des proportions de forme libre par deux fois supérieures à celles de la forme conjuguée et de l'ordre de celles précédemment trouvées. L'intestin, par contre, renferme une proportion très élevée de forme conjuguée près de 6 fois supérieure à la forme libre et représentant 4 % de la dose injectée. De plus, les quantités retrouvées pour le foie et les reins présentent un aspect qui contraste fortement avec le cas du Dilaudid : dans le rein, absence de forme libre et forme liée correspondant à 4 % de la dose injectée ; dans le foie, équivalence des formes libres et liées représentant au total 4,2 % de la dose injectée.

Ainsi se différencient très nettement les modes de distribution et d'élimination qui, dans le cas de l'Eukodal, paraissent prendre la voie intestinale dans une proportion élevée.

6. — Quelques dosages effectués à retardement nous ont montré, malgré la conservation au froid (+ 4°), qu'une certaine hydrolyse des formes conjuguées pouvait se produire sous l'influence des enzymes tissulaires, libérant ainsi une certaine proportion de forme libre.

7. — Nous avons caractérisé la nature de la conjugaison dans la forme liée des alcaloïdes. Il s'agit de combinaison avec l'acide glycuronique. Nous avons en effet pu mettre en évidence la présence du groupement glycuronique dans la forme liée hautement purifiée par chromatographie. Cette glycuroconjugaison s'effectue sur la fonction phénol en 3 dans le cas du Dilaudid et sur la fonction alcool en 8 pour l'Eukodal.

8. — Il ressort encore de ce travail que tout au moins dans le cas de prélèvement récents, non suspects de dégradation enzymatique avancée, l'élimination des formes conjuguées porte la signature du passage de l'alcaloïde à travers l'organisme.

De plus, l'importance de celles-ci implique de les rechercher soit d'emblée en s'inspirant des méthodes de Woods adaptées par M. et P. CHAMBON, soit dans les solutions résiduelles déjà épuisées classiquement lors d'une expertise systématique selon le protocole de la méthode de STASS qui les ignore.

Le Président de la Thèse :

Prof. CHAMBON

Vu, le Doyen :

J.-F. CIER

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 17 Janvier 1964

Le Recteur,
Président du Conseil
de l'Université :

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDEL-RAHMAN (A.A.). — Anwendung der papier chromatographie auf einige opium-alkaloide und einige morphinderivate. *Arch. Pharmazie*, 1957, (290), 232-235.
2. ACHOR (L.B.) and GEILING (E.M.K.). — Morphin antagonist. I. The distribution and excretion of morphine C¹⁴ in the presence of N-allyl-Normorphine and -5-amino-acridine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1956, (117), 16-19.
3. ADLER (T.K.). — A newly identified metabolic product of codeine : N-demethylated codeine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1952, (106), 371.
4. ADLER (T.K.), FUJIMOTO (J.M.), WAY (E.L.) and BAKER (E.M.). — The metabolism fate of codeine in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1955, (114), 251-262.
5. ADLER (T.K.) and LATHAM (M.E.). — Demethylation of C¹⁴ labelled Codeine in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, (73), 401-404.
6. ADLER (T.K.) and SHAW (F.H.). — The biological liberation of morphine from codeine in the rat. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1952, (104), 1-10.
7. ALEXANDER (A.). — Ueber Eukodalismus. *Münch. Med. Wschr.*, 1920, (67), 873-874.
8. AXELROD (J.). — The enzymatic conversion of codeine to morphin. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1955 b, (115), 259-267.
9. AXELROD (J.). — Enzymatic N. demethylation of narcotic drugs. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1956 a, (117), 322-329.
10. AXELROD (J.) and INSCOE (J.K.). — Glycuronide formation of narcotic drugs in vitro and in vivo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, (103), 675-676.

11. BASSETT (C.M.). — The use of Dilaudid in general practice. *J. Oklahoma-State. Med. Assoc.*, 1935, (28), n° 5, 178-181.
12. BECK (O.). — Ueber erfahrungen mit Eukodal. *Münch. Med. Wschr.*, 1923, (70), 908.
13. BONSMANN (M.R.). — Über euwirkung von opiumderivaten auf die diurese des hundes sowie beobachtungen über gewöhnungen an diese. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1930, (156), 145-159.
- 13 bis. BONSMANN (M.R.). — Schlafmittel und diurese beim hunde. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1930, (156), 160-175.
14. BOYER (P.). — Sur quelques nouveaux dérivés des alcaloïdes de l'opium (Eucodal, Dicodide et Dilaudide). *Bulletin Médical.*, 1929, (14), 27-30 mars, 393-400.
15. BRADFORD (L.W.) and BRACKETT (J.W.). — Systematic procedure for the identification of dangerous drugs, poisons and narcotics by ultraviolet spectrophotometry. *Mikrochim. Acta.*, 1958, 253-283.
16. BRODIE (B.B.) and UDENFRIEND (S.). — The estimation of basic organic compounds and a technique for the appraisal of specificity. *J. Biol. Chem.*, 1945, (158), 705-714.
17. BUCHWALD (M.E.) and EADIE (G.S.). — Toxicity of dilaudid injected intravenously into mice. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1945, (71), 197-202.
18. BÜHLER (M.). — Zum nachweis alkaloidartiger substanzen im harn mit der papierchromatographischen methode nach Jatzkewitz. *Röntgen-Laborat. Praxis. Stuttgart.* 1957, (10), 284-289, H. 10.
19. BUTSCH (W.L.), MCGOWAN (J.M.) and WALTERS (W.). — Clinical studies on the influence of certain drugs in relation to biliary pain and to the variations in intra-biliary pressure. *Surg. Gyn. Obstetr.*, 1936, (63), 451-456.
20. CHAMBON (M.). — Considération sur l'altération de certains alcaloïdes au cours de leur extraction par les solvants organiques riches en peroxydes. *IX^e Congrès des Sociétés de Pharmacie de France*, Clermont-Ferrand, juin 1957.

21. CHAMBON (M.) et CHAMBON (P.). — Considérations sur de nouvelles méthodes de recherche de la morphine au cours d'une expertise toxicologique. *Annales de Médecine légale*, 1961, (41), 35-43.
22. CHAMBRON (M.). — Acide glycuronique et glycuconjugaison. *Thèse Pharmacie*, Lyon, 27 avril 1934, n° 196.
23. CHASE (H.F.), BOYD (R.S.) and ANDREWS (P.M.). — N-Allyl-Normorphine in treatment of dihydromorphinone and methorphan overdosage. *J. Am. Med. Ass.*, 1952, (150), 1103-1104.
24. COCHIN (J.) and DALY (J.W.). — Rapid identification of analgesic drugs in urine with Thin-Layer chromatography. *Experientia*, 1962, (18), 294-295.
25. DASTUGUE (G.) et HOSPITAL (P.). — Nouvelles recherches sur le pouvoir acétylcholinomimétique comparé de l'ésérine et de la dihydro-oxycodéine. *Thérapie*, 1955, (10), 718-722.
26. DAVID (N.A.). — Dilaudid and morphine effects on basal metabolism and other body functions. *J. Am. Med. Ass.*, 1934, (103), 474-478.
27. DENOEL (A.). — Dosage photométrique de petites quantités de morphine et de dihydromorphinone. *J. Pharmacie Belg.*, 1946, (1), 241-247.
28. DESOILLE, COLIN et FELDSTEIN. — Intolérance à l'Eubine. *Arch. Maladies professionnelles*, 1947, (8), 281-282.
29. DISCHE (Z.). — A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, 1947, (167), 189-198.
30. DITTRICH (A.). — Klinische erfahrungen mit dem neuen morphium präparat. Dilaudid. *Münch. Med. Wschr.*, 1926, (LXXIII), 683-684.
31. DUPOUY (R.). — Note sur l'eubinisme. *Presse Médicale*, 1933, 30 déc., 2120.
32. EDDY (N.B.). — Dilaudid (dihydromorphinone hydrochloride). *J. Am. Med. Ass.*, 1954, (100), 1032-1035.
33. EDDY (N.B.) and REID (J.G.). — Studies of morphine, codeine and their derivatives. VII. Dihydromorphine (Paramorphan), dihydromorphinone (Dilaudid) and dihydrocodeinone (Dicodide). *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 1934, (52), 468-493.

34. EICHHOLTZ (F.). — Über die atemungslähmende wirkung der opiate. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1940, (66), 792-795.
35. ELLIOT (H.W.), TOLBERT (B.W.), ADLER (T.K.) and ANDERSON (H.H.). — Excretion of Carbon-14 by man after administration of Morphine-N-Methyl-C¹⁴. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, (85), 77.
36. EMERSON (G.A.) and MOODEY (C.R.). — Action of Dilaudid on the intestine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1935, (32), 327-329.
37. ERCOLI (N.) and LEWIS (M.N.). — Studies on analgesics. I. The time-action curves of morphine, codeine, Dilaudid and Demerol by various methods of administration. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1945, (84), 301-317.
38. FABRE (M.R.). — Le sort de la morphine dans l'organisme. *J. Pharm. et Chim.*, 1924, (30), 183-187.
39. FALK (E.). — Eukodal, ein neues narkotikum. *Therap. Monatsh.*, 1919, (XXXIII), 180-186.
- 39 bis. FALK (E.). — Eukodal, ein neues narkotikum. *Med. Klin.*, 1925, (29), 1087.
40. FISHMAN (W.H.) and GREEN (S.). — Microanalysis of glucuronide glucuronic acid as applied to β -glucuronidase and glucuronic acid studies. *J. Biol. Chem.*, 1955, (215), 527-537.
41. FRANÇOIS (M.) et SEGUIN (L.). — Sur la préparation d'un iodobismuthate de quinine amorphe et son analyse. *J. Pharm. et Chim.*, 1925, (2), 59-69.
42. FREITWURST (F.) and AHLHELM (H.A.). — Untersuchungen über den glucuronsäure-stoffwechsel beim menschen nach peroraler und intravenöser zufuhr. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1953, (217), 382-398.
43. FREUND (M.) und SPEYER (E.). — Über die umwandlung von thebain in oxycodoinon und dessen derivate. *J. Prakt. Chem.*, 1916, (94), 135-178.
44. FREUND (M.) und SPEYER (E.). — Fachgruppe für organische chemie. *Z. Angew. Ch.*, 1917, (30), 530-531.
45. FRIEBEL (H.), REICHLE (C.) und GRAIVENITZ (A.V.). — Zur hemmung des hustenreflexes durch zentral angreifende arzneimittel. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1955, (224), 384-400.

46. FRIEDLANDER (A.A.). — Eukodalismus und gesetz. *Psychiat. Neurol. Wchnschr., Halle*, 1926, (XXVIII), 95.
47. FREISCHMANN (F.). — Über die ausscheidung von Dicodid und Dilaudid beim hund nach intramuscülärer verabfolgung. *Inaugural Dissertation, Erlangen*, 1936.
48. FUJIMOTO. — Isolation of a purified form of bound morphine from human urine. *Fed. Proc.*, 1956, (15), 425.
49. FUJIMOTO (J.M.) and WAY (E.L.). — Characterization of a bound form of morphine in human urine. *Fed. Proc.*, 1954, (13), 356.
50. FUJIMOTO (J.M.) and WAY (E.L.). — Isolation and crystallization of « Bound » morphine from urine of human addicts. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1957, (121), 340-346.
51. FUJIMOTO (J.M.), WAY (E.L.) and HINE (C.H.). — Rapid method for estimation of morphine. *J. Laborat. Clin. Med.*, 1954, (44), 627-635.
52. GAENSLER. — Quantitative determination of visceral pain threshold in man. *J. Clin. Invest. Cincinnati*, 1951, (30), 406-420.
53. GIARMAN (N.J.) and CONDOURIS (G.A.). — The antidiuretic action of morphine and some of its analogs. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1954, (97), 28-33.
54. GLASSON (B.). — Etat actuel de la question des succédanés synthétiques de la morphine. *Rev. Med. Suisse Romande*, 1951, (71), 484-492.
55. GOTTLIEB. — Vergleichende messungen über die gewöhnung des atemzentrums an Morphine, Dicodid und Dilaudid. *Münch. Med. Wschr.*, 1926 (73), 595-596.
56. GRAGE. — Erfahrungen mit dem morphin derivat Dilaudid. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1927, (53), 1979-1981.
57. GROSS (E.G.) and THOMPSON (V.). — The excretion of a combined form of morphine in tolerant and non-tolerant dogs. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1940, (68), 413-418.
58. GRUBER (C.M.) and BRUNDAGE (J.T.). — A comparative study of the action of morphine and dilaudid (dihydromorphinone hydrochloride) on the intact small intestine of the dog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1935, (53), 120-136.

59. GRUBER (C.M.) and GRUBER (C.M.). — N-ally-normorphine as a antagonist to the intestinal spasm produced by addicting analgesics. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1953, (109), 157-158.
60. GUJRA (M.L.) and KHANNA (B.V.). — Comparative evaluation of some of the narcotic analgesics. *J. Sci. Ind. Research.*, 1957, (16 C), 11-13.
61. GUNST (W.). — Über erfahrungen mit dem antithrombotikum thrombocid in der chirurgie. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1952, (77), 806-808.
62. HAAS (H.). — Vergleichende untersuchungen über analgetica. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1955, (225), 442-52.
63. HAAS (H.), HOHAGEN (E.) und KOLLMANNSPERGER (G.). — Vergleichende untersuchungen mit analgeticis. *Arzneim. Forsch.*, 1953, (3), 238-247.
64. HARTUNG (C.). — Klinische erfahrungen mit Dilaudid *Dtsch. Med. Wschr.*, 1927, (LXXIV), 282.
65. HAZARD (R.). — Succédanés de la morphine et de la codéine : dilauidide, dicodide, eucodal, acédicone. *J. Pharm. Chim.* 1930, (12), 312-320.
66. HAZARD (R.). — Les récentes acquisitions en thérapeutique. *Journal de Médecine et de Chirurgie pratique*, 1929, 10 déc., (100), 849-851.
67. HILF (R.), CASTANO (F.) and LIGHTBOURN (G.). — Identification of alkaloids and related compounds by paper chromatography and ultraviolet spectrophotometry. *J. Laborat. Clin. Med. S.Louis*, 1959, (54), 634-639, n° 4.
68. HIRSCHBERG (F.). — Ueber eukodal in der magen-darmthergie. *Ther. der Gegenwart.*, 1923, (LXIV), 205-207.
69. HOTOVY (R.). — Messung zentrabanal getischer wirkungen mit der Regnierschen methode. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1956, (228), 387-402.
70. HUGGINS (R.A.), GLASS (W.G.) and BRYAN (A.R.). — Protective action of N-allyl-normorphine against respiratory depression produced by some compounds related to morphine. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1950, (75), 540-541.
71. HUGGINS (R.A.), GLASS (W.G.) and BRYAN (A.R.). — The cardiovascular effects of some narcotics. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1951, (86), 112-120.

72. HUGGINS (R.A.), HANDLEY (C.A.) and FORGE (M.La.). — Effects of morphine, codeine and dilaudid on blood flow. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1949, (95), 318-321.
73. JATZKEWITZ (H.). — Ein Klinisches verfahren zur bestimmung von basischen suchtmitteln im harn. *Hoppe Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, 1953, (292), 94-100.
74. JATZKEWITZ (H.) und LENZ (U.). — Zur leistungsfähigkeit einer papier chromatographischen methode beim Klinischen suchtmittelnachweis an hand von 1000 laufenden untersuchungen. *Hoppe. Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, 1956, (305), 53-60.
75. JINDRA (A.), KALVODA (R.) und ZYKA (J.). — Polarometrische bestimmung einiger pharmazeutisch wichtiger stoffe mit P. diazobenzensulfonsäure. *Collect. Travaux Chim. Tchecoslov.*, 1950, (15), 797-806.
76. KAISER (H.) und JORI (H.). — Beitrage zum toxikologischen nachweis von Dromoran « Roche », Morphine, Dilaudid, Cardiazol, Coramin und atropin mit hilfe der papierchromatographie. *Arch. Pharmazie*, 1954, (287), 253-258.
77. KEIL (W.) und PÖHLS (F.H.). — Über analgesie und atemwirkung der morphingruppe. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1936, (181), 285-291.
78. KEIM (P.). — Ueber das dihydrooxykodeinonchlorhydrat. (Eukodal). *Münch. Med. Wschr.*, 1923, (LXX), 466.
- 79 et 80. KEITH (E.F.) and DE BOER (B.). — The effect of N-allyl-normorphine on narcotic-induced hyperglycemia. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1955, (101), 481-487.
81. KORALEWSKI (F.). — Dilaudid in der Chirurgie. *Med. Klin.*, 1936, (32), 93.
82. KREHL (L.). — Aerztliche erfahrungen mit dilaudid. *Münch. Med. Wschr.*, 1926, (73), 96-97.
83. LAMPERT (H.). — Behandlung des gallen-bzw. *Münch. Med. Wschr.*, 1954, (96), 1121.
84. LEMPERG (F.). — Tod durch eukodalismus. *Zentralbl. f. innere. Med.*, 1926, (XLVII), 57-61.
85. MACHT (D.I.). — Influence of opiates on blood coagulation. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1952, (106), 405.

86. MACHT (D.I.). — Influence of some narcotics and sedatives on blood coagulation. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1953, (93), 325-336.
87. MANNERING (G.J.), DIXON (A.C.), BAKER (E.M.) and ASAM (T.). — The in vivo liberation of morphine from codeine in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1954, (111), 142-146.
88. MARCH (C.H.) and ELLIOTT (H.W.). — Biological studies with radioactive morphine. *Fed. Proc.*, 1952, (11), 373.
89. MAYER (R.F.). — Vergleichende beobachtungen uber die wirkung der wichtigsten narkotika der opiumgruppe. *Münch. Med. Wschr.*, 1927, (LXXIV), 1657.
90. MEDAKOVIÉ (M.). — Action of morphin and morphin-like analgesics applied on the intraluminally peristaltic reflex of the isolated guinea pig ileum. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1959, (11), 43-48.
91. MELLETT (L.B.) and WOODS (L.A.). — Excretion of urinary N-C¹⁴ methyl-morphine and pulmonary C¹⁴O₂ in the monkey and dog after subcutaneous injection of the labelled drug. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1961, (106), 221-223.
92. MENNINGER-LERCHENTHAL (E.). — Chronische dilaudid-vergiftung (Dilaudidismus). *Chem. Zentr.*, 1933, (1), 808-809.
93. MERENDINO (K.A.). — Pharmacological aspects of gastric secretion. Part. I : The effect of opium alkaloids and an allied drug Demerol on pouch secretions in dogs. *Gastroenterology*, 1948, (10), 504-539.
94. MISRA (A.L.), MULÉ (S.J.) and WOODS (L.A.). — The preparation of tritium nuclear labelled morphine and evidence for its in vivo biotransformation to normorphine in the rat. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1961, (132), 317-322.
95. MITCHELL (J.B.) and PANKRATZ (D.S.). — Observations on the effects of dihydromorphinone-hydrochloride (Dilaudid) on the intact uterus of animals anesthetized by cerebral anemia. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1936, (56), 69-76.

96. MUELLER-ROLLAND (F.H.). — Eukodalismus und Gesetz. *Psychiat. Neurol. Wchnschr. Hall. a. s.*, 1926, (XXVIII), 27-30.
97. MUNIER (R.). — Séparation des alcaloïdes de leurs N-oxydes par microchromatographie sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, (35), 1225-1231.
98. MYERS (C.N.). — An investigation on the pharmacological action of some new substitutes for morphine and heroin. *Brit. Med. J.*, 1933, (II), 283-287.
99. MYERS (C.N.). — The effects of morphine, diacetyl-morphine and some related alkaloids upon the alimentary tract. *J. Hyg.*, 1940, (40), 583-604.
100. OBERST (F.W.). — Free and bound morphine in the urine of morphine addicts. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1940, (69), 240-251.
101. OBERST (F.W.). — Relationship of the chemical structure of morphine derivatives to their urinary excretion in free and bound forms. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1941, (73), 401-404.
102. OELKERS (H.A.). — Vergleichende untersuchungen über die wirkungsstärke des morphins und seiner derivate. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1940, (194), 296-307.
103. OELKERS (H.A.) und FIEDLER (H.). — Vergleichende untersuchungen über die wirkungsstärke des morphin und seiner derivate. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Pathe. Pharmacol.*, 1941, (197), 636-654.
- 103 bis. OGIER (J.). — Traité de Chimie Toxicologique. 2^e édition. E. Kohn-Abrest, 1924.
104. OSTERMAIER (W.). — Eukodal. *Der Prakt. Arzt.*, 1925, (15), 261.
105. PFEIFFER (C.C.), LEE (R.E.) and HEMMENS (E.S.). — The eosinophil response after dilaudid and acetylsalicylic acid. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1950, (98), 26.
106. POLONOVSKI (M.) et POLONOVSKI (M.). — Sur les aminoxydes des alcaloïdes (I). *Bull. Soc. Chim. France*, 1926, 1147-1167.
107. QUICK (A.J.). — The preparation of borneol-glycuronic acid and glycuronic acid. *J. Biol. Chem.*, 1927, (74), 331-341.

108. REICHLE (C.) und FRIEBEL (H.). — Zur Hemmung des hustenreflexes durch zentral angreifende arzneimittel. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1955, (226), 558-562.
109. REINIKÉ (A.). — Beitrag zur durchführung der modernen Kreislaufnarkose ohne intubation. *Münch. Med. Wschr.*, 1952, (94), 1455.
110. ROESCH (E.). — Über den antagonismus von N-allyl-normorphin zu morphin und eukodal am kreislauf von wachen hunden. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1955, (226), 518-526.
111. S. A. E. — N-allyl-normorphine a specific antipoinson to morphine. *Farm. Revy.*, 1953, (52), 272-273.
112. SANO (I.) und KAJITA (H.). — Nachweis von suchtmitteln im ham mit hilfe der hochspannungs elektrophorese. *Klin. Wochschr.*, 1955, (33), 956-958.
113. SCHOEN (P.). — Morphin und Dilaudid. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1929, (146), 84-86.
114. SCHRÖDER (G.). — Über veuere Medikamente und nährmittel zur behandlung der tuberkulose. *Zeitschr. f. Tub.*, 1921, (XXXIV), 107-124.
115. SCHÜBEL (K.). — Über die ausscheidung des Eukodals. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1934, (177), 34-37.
116. SEELIGER. — Sur un nouveau dérivé de la morphine. *J. Pharm. et Chim.*, 1929, (9), 163.
117. SEEVERS (H.M.). — Addiction potentialities of morphine, codeine, heroine and dilaudid in the monkey. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1934, (51), 141-142.
118. SEEVERS (H.M.). — Opiate addiction in the monkey. I. Methods of study. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1936, (56), 147-156.
119. SEEVERS (H.M.). — Opiate addiction in the monkey. II. Dilaudid in comparaisn with morphine heroine and codeine. *J. Pharmacol Exptl. Therap.*, 1936, (56), 157-165.
120. SEEVERS (H.M.) and PFEIFFER (C.C.). — A study of the analgesia, subjective depression and euphoria produced

- by morphine, heroine, dilaudid and codeine in the normal human subject. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 1936, (56), 166-187.
121. SEIBERT (R.A.), WILLIAMS (C.E.) and HUGGINS (R.A.). — The isolation and identification of bound morphine. *Science*, 1954, (120), 222-225.
122. SEIFERT (P.) und GELDMACHER (G.). — Zur papierchromatographischen analytik von aus alkalischem milieu extrahierbaren organischen giften. *Arch. Toxikol.*, 1955, (15), 305-312.
123. SPENGLER (G.). — Uber Eukodal. *Wien. Med. Wochs.*, 1923, (73), 809-810.
124. SPENGLER (G.A.). — Nachweis von opiaten und anderen pharmaka im urin mit hilfe der hochspannungselektrophorese. *Helvet. Med. Acta.*, 1958, (25), 430-435.
125. STANTON (E.J.). — Dihydromorphinone hydrochloride (Dilaudid) : its tranquilizing potency, respiratory depressant effects and addiction liability, as tested on the rat. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1936, (56), 252-263.
126. STEIGELMANN (G.). — Schmerzlinderung mit dilaudid in der geburtshilfe. *Med. Klin.*, 1935, (31), 1337.
127. STROMINGER (J.L.), KALCKAR (H.M.), AXELROD (J.) and MAXWELL (E.S.). — Euzymatic oxidation of uridine-diphosphate-glucose to uridine-diphosphate-glucuronic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, (76), 6411-6412.
128. TAKAMORI (A.E.). — Enzymatic studies on morphine glucuronide synthesis in acutely and chronically morphinized rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1960, (130), 370-374.
129. TIFFENEAU (M.). — V. Analgésiques morphiniques. *Paris Médical*, 15 juin 1929, (24), 576-578.
130. TOLLENS (B.) and RORIVE (F.). — Uber farben und spektralreaction der zuckerarten mit naphthoresorcin und salzsäure. *Ber. Chem. Ges.*, 1908, (41), 1783-1787.
131. VIDIC (E.). — Der Nachweis, die unterscheidung und quantitative bestimmung zentral wirkender, synthetischer analgetica, insbesondere des cliradons im urin. *Deut. Z. Ges. Gerichtl. Med.*, 1954, (42), 582-587.
132. VIDIC (E.). — Die auwendung papierchromatographischer methoden beim forensischen suchtmittelnachweis. *Arzneim Forsch.*, 1955, (5), 291-295.

133. VIDIC (E.). — Nachweis der renalen ausscheidungsprodukte toxikologisch wichtiger arzneistoffe mit hilfe der papierchromatographie. *Arzneim Forsch.*, 1957, (7), 314-319.
134. VIDIC (E.). — Ein neues reagens zur unterscheidung von morphinderivaten. *Arch. Toxicol.*, 1957, (16), 412-418.
135. WAGNER (G.). — Zur papierchromatographie und papierionophorese einiger dem morphin verwandter analgetica. *Pharmazie*, 1955, (10), 470-477.
136. WIKI (B.). — De l'Eukodal. *Rev. Med. Suisse Romande*, 1923, (43), 451-469.
137. WIKI (B.). — De l'influence, exercée par quelques succédanés de la morphine, sur l'air courant du lapin. *Rev. Med. Suisse Romande*, 1935, (55), 173-190.
138. WILLNER (K.). — Über die möglichkeit der trennung einiger wichtiger basischer suchtmittel mittels elektro-phorese. *Arch. Toxicol.*, 1959, (17), 347-356.
139. WOLF (W.). — Bedeutung von gebarmutterinnendruck und gebarmutterwendhärte für die wehenmessung und künstliche wehenerregung. *Arch. Gynäk.*, 1941, (171), 603-662.
140. WOODS (L.A.). — Distribution and fate of morphine in non-tolerant and tolerant dogs and rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1954, (112), 158-175.
141. WOODS (L.A.), COCHIN (J.), FORNEFELD (E.G.) and SEEVERS (M.H.). — Estimation of morphine in biological materials. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1954, (111), 64-73.
142. WOODS (L.A.) and MUEHLENBECK (H.E.). — Urinary excretion of codeine and its metabolites in the dog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1954, (110), 54.
143. WRIGHT (C.I.) and BARBOUR (F.A.). — The effect of morphine, dilaudid, dicodid and dihydrodesoxymorphine D on the respiratory activity of rabbits. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1934, (51), 139.
144. WUHRMANN (F.). — Zur therapie der akuten lebensbedrohenden erkrankungen der kreislauforgane maladie. *Praxis, Berne*, 1959, (48), 1-6.
145. ZBIRAL. — Das Eukodal in der chirurgie. *Wien. Med. Woch.*, 1923, (LXXIII), n° 6, 311-312.
146. ZINDLER (M.) und GANZ (P.). — Ein antidot der opiate. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1955, (80), 410-412.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
PREMIÈRE PARTIE. — <i>Généralités et travaux antérieurs</i> ..	23
I. Chlorhydrate d'hydromorphone	23
II. Chlorhydrate de dihydrone	29
III. Travaux antérieurs sur la détection, l'identification, le dosage de l'hydromorphone et de la dihydrone, et sur leurs métabolismes	33
DEUXIÈME PARTIE. — <i>Travail personnel</i>	35
I. Métabolisme et élimination de l'hydromorphone (Dilaudid) chez le chien	35
1. Méthodes de dosage	35
2. Dosage de l'hydromorphone chez le chien N° 1	44
3. Dosage de l'hydromorphone chez le chien N° 2	48
4. Identification de l'hydromorphone dans les urines et la bile chez le chien N° 1 et N° 2	51
5. Identification du dérivé de conjugaison de l'hydromorphone dans les urines	60
II. Métabolisme et élimination de la dihydrone (Eukodal) chez le chien	68
1. Méthode de dosage	68
2. Dosage de la dihydrone chez le chien N° 3	70

3. Identification de la dihydrone dans les urines et la bile	73
4. Identification de la forme conjuguée de la dihydrone dans les urines	74
Discussion	77
CONCLUSIONS	85
BIBLIOGRAPHIE	89

